



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAMON CÉSAR OLIVEIRA RIBEIRO

**POTENCIAL EPIGENÉTICO DE HIDROXAMATOS NA MODULAÇÃO DA
EXPRESSION DE HISTONAS DESACETILASES (HDACS) EM LINHAGEM
LEUCÊMICA (HL-60).**

FORTALEZA - CE

2022

RAMON CÉSAR OLIVEIRA RIBEIRO

POTENCIAL EPIGENÉTICO DE HIDROXAMATOS NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HISTONAS DESACETILASES (HDACS) EM LINHAGEM LEUCÊMICA (HL-60).

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado

Coorientadora: Msc. Daniela de Paula Borges

FORTALEZA - CE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R372p Ribeiro, Ramon César Oliveira.
Potencial epigenético de hidroxamatos na modulação da expressão de histonas desacetilases (HDACS) em linhagem leucêmica (HL-60) / Ramon César Oliveira Ribeiro. – 2022.
58 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado .
Coorientação: Profa. Ma. Daniela de Paula Borges.

1. HL60. 2. Hidroxamatos. 3. HDACs. 4. Análises in silico. 5. Expressão gênica. I. Título.

CDD 570

RAMON CÉSAR OLIVEIRA RIBEIRO

POTENCIAL EPIGENÉTICO DE HIDROXAMATOS NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HISTONAS DESACETILASES (HDACS) EM LINHAGEM LEUCÊMICA (HL-60).

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado

Coorientadora: Ma. Daniela de Paula Borges

Aprovada em: 09/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Claudia dos Santos Luciano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Msc. Roberta Taiane Germano de Oliveira
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Para Lion,
Adelaide Ferreira de Oliveira
e a todos os profissionais da saúde e vítimas da
COVID-19.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus amigos, pelo estímulo e companheirismo nos momentos mais difíceis. Sem vocês, definitivamente, não teria chegado até aqui, meu muito obrigado.

Primeiramente, aos mais antigos: raramente as pessoas conseguem manter contato com suas amizades do ensino médio. Sinto-me privilegiado de ter conhecido todos do “XLC” e termos, todos, conseguido ingressar na UFC, o que facilitou MUITO mantermos o contato. À Lara, Patrícia, Miguel, João Victor, Marlos, Weslen, Chris, Wellyson, Breno, Arthie, XGabs e Matheus, meus sinceros agradecimentos por todos esses anos e por todos os Bailes ICÔNICOS que organizamos.

Para meu querido e estimado “Bionajas” fica a imensa gratidão por todo o período que vivemos na graduação. Todas os nossos encerramentos de semestre no ICA, risadas, viagens de campo e todo o suporte nos momentos de desespero, estas pequenas coisas foram cruciais para tornar a academia muito mais leve, suportar a rotina e me impedir de desistir deste curso. Muito obrigado Diego, Rayane, Mateus, Bia, Teresa, João Paulo, Vanessa, Rivando e, especialmente, Marcos (por ter sido o precursor do meu trajeto até a concussão desse trabalho). Tenho-lhes uma dívida eterna e desejo-lhes todo o sucesso do mundo.

Ao “Bonde da ELS”, quase faltam-me palavras para expressão o qual incrível foi o curto período em que nos conhecemos e formamos laços tão duradouros. Sem vocês a vivência e rotina do intercâmbio não teria sido 10% de tudo que passamos. Obrigado Natã, Lívia, Mairlane, Igor, Félix, Camila, Roberto e Larissa por terem me aturado todo este tempo e continuarem os mesmos, mesmo quando passo meses sem aparecer nos rolês.

Aos integrantes do Laboratório de Citogenômica do Câncer (LCC), obrigado pela oportunidade desses 2 anos e meio de convivência. Minha timidez sempre foi um fator determinante de bloqueio quando sou inserido em ambientes novos e desconhecidos, mas a receptividade e vontade de ensinar da Mayara, Sharlene e Manu fizeram com que minha adaptação fosse a mais confortável possível e, desde então, tento fazer o mesmo com os novos ICs. A nova geração chegou recentemente, mas, extremamente, interessada e com vontade de aprender. Clarissa, Gabi, Zé Roberto, Amanda, Dyllan e, em especial, Alessandro e Joyce (meus favoritos até então) tranquilizam-me de saber que o futuro do laboratório está em boas mãos.

À velha guarda, que já não faz mais parte do laboratório: Amanda, Ana, Breno, Gabriel e, principalmente, Camilla (por todos os choros, risadas e extrações) e Ligiane (pelos momentos incríveis, perrengues que passamos, companheirismo e packs de figurinhas) meus sinceros agradecimentos, por terem feito parte desta história. E aos sobreviventes, nem sei como

expressão o qual grato sou por terem-me dado suporte, mesmo sem saber, em todas as vezes que quis jogar tudo pro ar. Muito obrigado Vitinho, Letícia e Thayres, pelos ensinamentos e todas as conversas que tornaram a rotina laboratorial muito mais leve. No entanto, não posso deixar de ressaltar a Vanessa, minha simbiote desde o começo da graduação, e o Mateus, o melhor amigo hétero que surgiu no meio da pandemia e eu sequer percebi que precisava, muito, muito, muito obrigado por terem sido minhas âncoras no laboratório nestes últimos meses, por toda a disponibilidade, pelos desabafos e serem estes exemplos de pesquisadores e seres humanos. Gostaria que vocês conseguissem se ver através dos meus olhos, para perceber o qual incríveis vocês dois são, todo o sucesso do mundo ainda seria pouco e espero que consigamos manter este contato por muitos e muitos anos.

Ao Lion, meu cachorro, por esses 14 anos de companhia e, mesmo sem saber, ter sido uma âncora em tantos momentos. Amo-te e abrigado por me ter dado forças e motivos para continuar.

Para Luquinhas, meu terapeuta, meus mais sinceros agradecimentos, por ter me ajudado nos momentos de surto e mostrado um caminho quando não tinha ideia do que fazer.

À Cristiana Libardi, minha incrível orientadora, meu imenso obrigado por toda a paciência, atenção e cuidado, que, sinceramente, nem sei se merecia. Sua insistência e cobranças foram essenciais para que conseguisse concluir este trabalho.

Para Daniela Borges (Dani), minha coorientadora, nem consigo expressão o tamanho da minha gratidão. Quem imaginaria que a pessoa que mais tinha medo no LCC fosse ser tão doce, atenciosa e pilar central para que conseguisse terminar meu TCC. Desejo-lhe todo o sucesso em sua vida profissional e agradeço por ser esse exemplo incrível de pesquisadora.

E a todos aqueles que, mesmo depois de todos esses anos, ainda perguntam pela tampa.

“My community dies, everyday. Whether is from HIV and AIDS or transfobia or homofobia.

I ask you to consider this. There is a human being, We're ALL human beings. It's about inclusivity and I'll NEVER, EVER ask for any of any of you, for respect.

I will DEMAND IT.”

(Dominique Jackson, 2019).

RESUMO

O câncer continua sendo uma das principais causas de morte no mundo. Estudos com alvos em metabolismo energético, terapias combinadas e alterações genéticas e epigenéticas vem sendo utilizadas a fim de encontrar novas alternativas terapêuticas. Com isso, estudos bioinformáticos, como os de análise *in silico* quando associado a experimentos de fase pré-clínica, permitem validar o potencial biológico e mecanismos moleculares de novos fármacos. Dentre os compostos atualmente aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) os Hidroxamatos têm se destacado em tratamentos oncológicos, pela sua eficiência na modulação de proteínas histonas, favorecendo sua inibição e silenciamento gênico via inibidores de histona desacetilase (iHDAC). Desta forma, este trabalho objetiva analisar o potencial epigenético *in vitro* de dois protótipos da classe dos hidroxamatos (LDT565 e LDT566), como potenciais agentes antitumorais, na regulação dos genes *HDAC1* e *HDAC2*. Os experimentos para validação de mecanismos de ação e atividade biológica foram guiados por ensaios de citotoxicidade, análises de expressão gênica em linhagem de câncer hematológico (HL60) e análises *in silico* de potenciais alvos. Foi utilizado como controle o composto comercial Vorinostat. A partir disso, foi observada a atividade de crescimento inibitório, dependente do tempo (24h, 48h ou 72h) e concentração, onde há semelhança entre os compostos sintéticos e o Vorinostat. O composto LDT565 destaca-se por apresentar resultados de IC50 similares desde as 24hs de tratamento (24h = 1,85; 48h = 1,19; 72h = 1,43). Também foi possível analisar um potencial inibição da expressão gênica de *HDAC1* e *HDAC2* após 12h de incubação para ambos compostos analisados (LDT565 e LDT566) e o controle positivo (Vorinostat). Após 24h de incubação o composto LDT566 apresentou reduziu a expressão da *HDAC1* e *HDAC2*, sendo que o LDT565 inibiu somente a *HDAC1*. A análise *in silico* evidenciou que a HDAC1 regula diversos genes envolvidos no processo de carcinogênese sendo que o maior score de interação foi com a proteína EP300 (histona desacetilase), sendo que também foram relacionadas as proteínas TP53, RB1 e RBL conhecidamente envolvidos no processo de carcinogênese. A HDAC2 apresentou alto score de interação com todos os alvos relacionados, dentre eles as DNMT1 (DNA metiltransferases), o CDH4 e ainda o TP53. Ambos compostos apresentam atividade inibitória dos genes *HDAC1* e *HDAC2* semelhante ao composto comercial, de maneira tempo dependente. Ambos alvos HDAC1 e HDAC2 participam da regulação de genes relacionados ao processo de carcinogênese, sendo um importante alvo molecular na terapia anticâncer.

Palavras-chave: HL60; hidroxamatos; HDACs; análises *in silico*; expressão gênica.

ABSTRACT

Cancer remains one of the leading causes of death worldwide. Studies with targets in energetic metabolism, combined therapies and genetic and epigenetic modifications have been used to identify the new therapeutic strategy. Bioinformatics studies, such as *in silico* analysis when associated with preclinical trials experiments, allow the validation of antitumor potential and molecular pathways of new compounds in drug discovery. The hydroxamates have been approved by the FDA (Food and Drug Administration) and are in current use in hematological treatment, due to their efficiency in modulating histone proteins, favouring their genetic silencing via histone deacetylase inhibitors (HDACi). Therefore, this work aims to analyze the *in vitro* epigenetic potential of two prototypes of the hydroxamate class (LDT565 and LDT566), as potential cellular antitumor agents in the regulation of *HDAC1* e *HDAC2* gene expression. The experiments to validate the mechanisms of action and biological activity were conducted by toxicity trials, gene expression analysis in a hematological cell line (HL60) and *in silico* analysis. The commercial compound Vorinostat was used as a positive control. Up to this point, growth activity was observed, time (24h 48h and 72h) and concentration depending, where were found similarities between the synthetic compounds and Vorinostat, but LDT565 stands out for presenting similar IC50 results since 24h of treatment (24h = 1.85; 48h = 1.19 and 72h = 1.43). It was also possible to analyze the inhibition of gene expression for *HDAC1* and *HDAC2* in 12h incubation between both the prototypes analyzed (LDT565 e LDT566) and the positive control (Vorinostat). After 24h incubation, the compound LDT566 demonstrated inhibition only in *HDAC1*. The *in silico* analysis showed that HDAC1 regulates a load of genes involved in the carcinogenic process, being the heights interaction scores related to the protein EP300 (histone deacetylase), but it was also correlated to TP53, RB1 and RBL proteins, widely involved in the carcinogenic process. HDAC 2 demonstrated a high score interaction with all the correlated targets, such as the DNMT1 (DNA methyltransferases), CDH4 and TP53. Both compounds presented inhibitory activity for *HDAC1* e *HDAC2*, like the commercial compound, in a time-dependent way. HDAC1 and HDAC2 targets participate in the regulation of genes related to the carcinogenesis process, being an important molecular target in anticancer therapy.

Keywords: HL60; hydroxamates; HDACs; *in silico* analysis; gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência dos diversos tipos de câncer entre homens e mulheres no Brasil.	15
Figura 2	Processo de progressão tumoral	16
Figura 3	Microambiente tumoral e seus principais constituintes.	17
Figura 4	As Marcas celulares e moleculares (<i>Hallmarks</i>) do câncer	20
Figura 5	Novos <i>Hallmarks</i> do câncer	22
Figura 6	Estrutura do Nucleossomo	24
Figura 7	Processo de acetilação e desacetilação de histonas	25
Figura 8	HDAC1: Localização da <i>HDAC1</i> no genoma (A) e conformação proteica da HDAC1	29
Figura 9	HDAC2: Localização da <i>HDAC2</i> no genoma (A) e conformação proteica da HDAC2	31
Figura 10	Principais representantes do hidroxamatos: (A) Vorinostat; (B) Belinostat; (C) Pabinostat.	34
Figura 11	Rede de interações de HDAC1	39
Figura 12	Rede de interações da HDAC2	43
Figura 13	Padrão de expressão dos genes HDAC1 e HDAC2 em linhagem HL60 após incubação com hidroxamatos LDT565 e LDT566.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Hallmarks e terapias alvo-dirigidas para o tratamento do câncer.	21
Tabela 2	Descrição das Classes de HDACs	27
Tabela 3	Descrição dos fármacos inibidores de HDAC e suas características	32
Tabela 4	Sequências dos <i>primers</i> utilizados.	37
Tabela 5	Dados sobre a rede de interação da HDAC1	38
Tabela 6	Interação proteína-proteína e score combinado de acordo com o String para HDAC1..	39
Tabela 7	As principais Processos Biológicos e Funções moleculares na rede de interação da proteína HDAC1	41
Tabela 8	Dados sobre a rede de interação da HDAC2	42
Tabela 9	Interação proteína-proteína e score combinado de acordo com o String para HDAC2.	43
Tabela 10	As principais Processos Biológicos e Funções moleculares na rede de interação da proteína HDAC2	46
Tabela 11	Valores de CI50 dos Hidroxamatos (LDT565, LDT566 e Vorinostat) após 24, 48 e 72h tratamento em linhagem hemato-oncológica (HL60) e índice de seletividade (IS) calculado a partir CI50 calculada em linhagem não tumoral (L929).	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPCNP	Câncer Pulmonar de Células não-Pequenas
CTH	Células Tronco Hematopoiéticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC ₅₀	Potência Do Fármaco
HAT	Histona Acetil Transferase
HDAC	Histona Desacetilase
HDAC1	Histona Desacetilase 1
HDAC2	Histona Desacetilase 2
HMBA	Bis-acetamida Hexametileno
IC ₅₀	Concentração Inibitória
iHDAC	Inibidores de Histona Desacetilase
IPP	Interação Proteína-Proteína
IS	Índice de Seletividade
LCCP	Linfoma Cutâneo De Células Periféricas
LCCT	Linfoma Cutâneo De Células T
LH	Linfoma de Hodgkin
LLC	Leucemia Mieloide Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LNH	Linfoma não Hodgkin
miRNA	Micro RNA
MM	Mieloma Múltiplo
MO	Medula Óssea
NMPs	Neoplasias Mieloproliferativas
RC	Remissão Completa
RNA	Ácido Ribonucleico
SAHA	Ácido Hidroxâmico Superoilânica
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer	14
1.2	Onco-hematologias	17
1.2.1	<i>Leucemia Mieloide Aguda</i>	17
1.2.2	<i>Linhagem HL-60</i>	19
1.3	Marcas Celulares e Moleculares do Câncer (Hallmarks do Câncer)	20
1.4	Epigenética e Câncer	23
1.5	HDAC – Histonas Desacetilases	26
1.5.1	<i>HDAC1 - Histonas Desacetilases 1</i>	28
1.5.2	<i>HDAC2 - Histonas Desacetilases 2</i>	30
1.6	iHDAC – Inibidores de Histonas Desacetilases	31
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo Geral	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	<i>Análise in silico</i>	36
3.2	Análise Celular - Potencial citotóxico dos compostos alvo em linhagem leucêmica	36
3.3	Análise Molecular	36
3.4	PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	37
4	RESULTADOS	38
4.1	<i>Análise in silico das proteínas HDACS</i>	38
4.2	Perfil citotóxico dos hidroxamatos em linhagem hematológica HL-60	46
4.3	Potencial de Modulação Epigenética dos Hidroxamatos	47
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Avanços em saúde pública, diagnóstico precoce e tratamentos mais eficazes demonstram que, cada vez mais, é possível uma vida com e além do câncer. No entanto, as formas de tratamento mais difundidas e acessíveis continuam sendo: quimioterapia, radioterapia e ressecção cirúrgica (TRAPANI, 2017; HAUSMAN, 2019). A utilização de fármacos quimioterápicos tem demonstrado resultados significativos no tratamento de leucemias, linfomas e alguns tipos de tumores sólidos (como mama e pulmão). Não obstante, a utilização de terapias alvo-dirigidas, com análise dos mecanismos moleculares envolvidos e tratamentos de medicina personalizada têm demonstrado resultados promissores no tratamento de diversos cânceres, melhorando o prognóstico e sobrevida dos pacientes (FAUBERT, SOLMONSON & DEBERARDINIS, 2020; PLUTYNSKI, 2018).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) foram diagnosticados 19,3 milhões pessoas com câncer em 2020, destas foram quase 10 milhões de óbitos sendo que mais de 60% encontram-se entre os 10 tipos de câncer mais frequentes e são responsáveis por 70% dos óbitos (SUNG et al., 2020). Quando comparado com os dados de 2018, nota-se, pela primeira vez, uma incidência maior de câncer de mama que de pulmão (Sung, et al., 2021). Segundo estimativa da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) 1 em cada 5 pessoas vai desenvolver câncer ao longo da vida. Dentre esse número, 1 em 8 homens e 1 em 11 vêm a óbito. No mundo, estima-se que mais de 50 milhões de pessoas vivem com câncer, passados 5 anos desde o diagnóstico. Os principais fatores desencadeadores desse aumento são a senescência da população global e fatores de vulnerabilidade socioeconômica (FERLAY et al., 2020).

No Brasil, o número de pessoas diagnosticadas, com algum tipo de câncer, foi de 522.212 e o número de óbitos foi de 260.000. Os cânceres de maior prevalência na população foram: próstata, mama, colorretal e pulmão. Entre os homens, tem-se o predomínio dos cânceres de próstata, colorretal e pulmão. Já entre as mulheres a prevalência é entre os cânceres de mama (30% dos novos casos), colorretal e tireoide (Figura 1). Em números de prevalência, quando analisados os últimos 5 anos, tem-se 1,5 milhão de pessoas vivendo com câncer no Brasil (INCA, 2020; FARLEY et al., 2020).

Figura 1: Prevalência dos diversos tipos de câncer entre homens e mulheres no Brasil. 2020, INCA.

%	Casos Novos	Localização Primária
29,2	65.840	Próstata
9,1	20.540	Cólon e Reto
7,9	17.760	Traqueia, Brônquio e Pulmão
5,9	13.360	Estômago
5	11.200	Cavidade Oral
3,9	8.690	Esôfago
3,4	7.590	Bexiga
2,9	6.470	Laringe
2,6	5.920	Leucemias
2,6	5.870	Sistema Nervoso Central
100	225.980	Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma
	309.750	Todas as Neoplasias

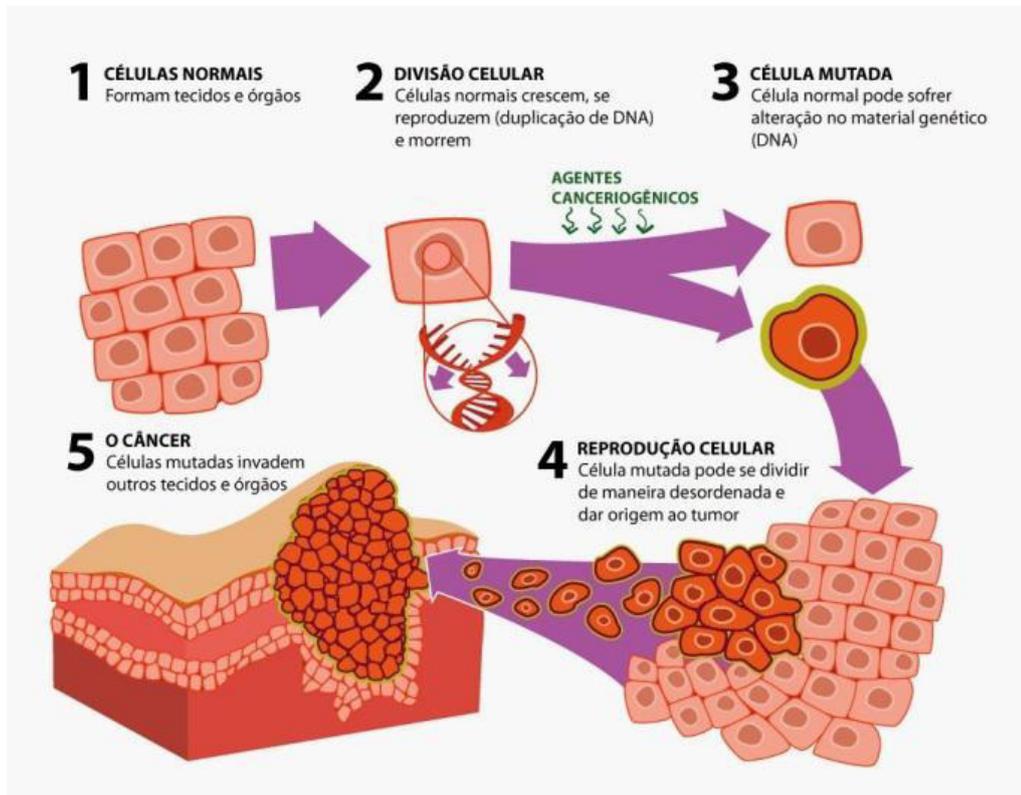


Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	66.280	29,7
Cólon e Reto	20.470	9,2
Colo do útero	16.710	7,5
Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6
Glândula Tireoide	11.950	5,4
Estômago	7.870	3,5
Ovário	6.650	3
Corpo do útero	6.540	2,9
Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4
Sistema Nervoso Central	5.230	2,3
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	223.110	100
Todas as Neoplasias	316.280	

Fonte: elaborada pelo autor.

No atual modelo de estudo de progressão oncogênica, o câncer tem sua gênese a partir de células que sofrem sucessivas alterações (mutações/alterações genéticas), acarretando numa divisão celular aberrante (MACHADO, 2020). Tais modificações podem tanto estar relacionadas à fatores intrínsecos (mutações hereditárias ou erros no processo de replicação do DNA) quanto extrínsecos (instabilidade gênica em decorrência de exposição à radiação, agentes químicos, infecções virais, etc.). No entanto, sabe-se que uma única mutação dificilmente induzirá a formação tumoral. São necessários, pelo menos, de 2 a 6 alterações no genoma, que desencadearão na interferência dos mecanismos de proliferação, reparo, diferenciação e morte celular (Figura 2) (HARRINGTON & TANNOCK, 2021).

Figura 2: Processo de Progressão tumoral. As sucessivas divisões celulares podem induzir a danos irreversíveis do DNA, devido a perda dos mecanismos de reparo. Com o acúmulo dessas mutações, têm-se o desenvolvimento de linhagens geneticamente alteradas e favorecimento da progressão descontrolada.

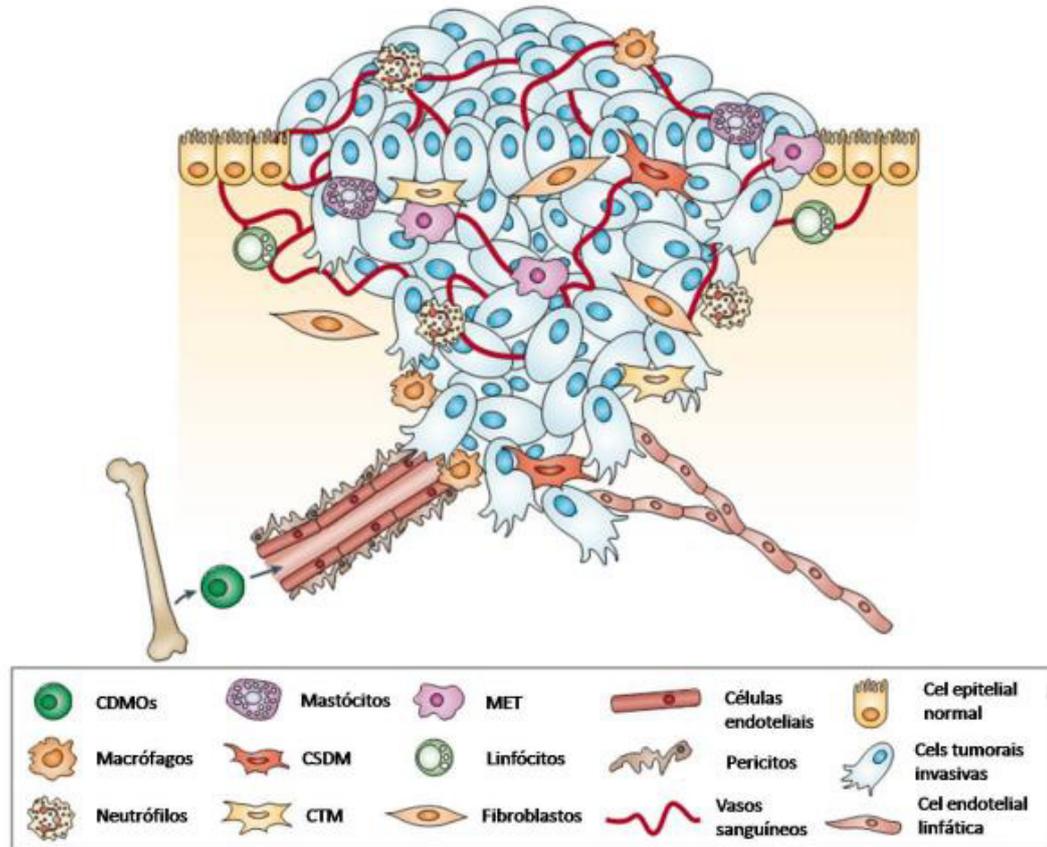


Fonte: FAUBERT, SOLMONSON & DEBERARDINIS, 2020

Apesar das células cancerígenas serem os primeiros alvos de alterações genéticas, a análise tumoral focada nessas células mostra-se, cada vez mais, reducionista e ultrapassada. Entender e perceber o câncer como um microambiente, onde o tumor interage com diversas outras células, mecanismos, vasos e substâncias produzidas localmente ou provenientes do transporte via irrigação sanguínea, é essencial para a complexa compreensão da evolução tumoral (Figura 3) (HANAHAN, 2000).

Segundo Hinshaw (2020), células não cancerígenas quimiocinas e citocinas tem papel tão importante para o desenvolvimento do tumor quanto as células mutadas em si, responsáveis pelos processos de metástase, angiogênese e proliferação celular. Por conseguinte, o tumor passa a comportar-se como um tecido complexo, perturbando a homeostasia tecidual original e induzindo as células “normais” a comportarem-se de acordo com a nova dinâmica imposta pelas citocinas tumorais.

Figura 3: Microambiente tumoral e seus principais constituintes. A ideia de observar o tumor como um conglomerado de células cancerígenas já é um conceito bastante ultrapassado. Com isso, observa-se várias citocinas e células que constituem o microambiente tumoral e participam no processo de progressão oncogênica.



Fonte: JOYCE & POLLARD 2009

Com isso, cada vez mais, vem surgindo estudos focados em analisar estas células peritumorais, a fim de desenvolver novas possibilidades terapêuticas, baseado em como estas células, frequentemente, conseguem manter suas taxas de proliferação normais e atividade genética estável (HINSHAWN & SHEVDE, 2019).

1.2 Onco-hematologias

Mutações somáticas acumulam-se em todas as células ao longo da vida. Em sua maioria, os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) são do tipo mutações ou Deleções. Estima-se que Células Tronco Hematopoiéticas (CTH) tenham, em média, ~20 mutações somáticas por ano em todo o seu genoma. Destas, apenas 0.1 mutações afetam éxons de proteínas codificantes (KIRÁLY et al., 2016). Na medula óssea (MO), apenas células tronco de

vida longa tem a capacidade de autorregeneração ao longo da vida do indivíduo, assim, em sua maioria, apenas mutações provenientes de CTHs persistirão no decorrer dela (JAISWAL et al., 2020). Dado que cada pessoa tem entre 50000 e 200000 células progenitoras é esperado, aproximadamente, 350000 a 1400000 mutações codificantes ao longo de 70 anos de idade. Se apenas uma dessas mutações for capaz de garantir vantagem seletiva nas células que lhes desencadearam, a expansão clonal sanguínea deve ser comum ao longo do envelhecimento. Além disso, este fenômeno, hematopoese clonal, tem sido fortemente relacionada ao envelhecimento em diversos estudos de pessoas não acometidas por doenças hematológicas (RIO-MACHIN et al., 2020; VOSO et al., 2019).

Na maioria desses estudos, as mutações usadas para definir hematopoiese clonal são similares aos encontrados em cânceres hematológicos. Os genes mais comumente mutados em hematopoieses clonais são: *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *TP53*, *JAK2* e *SF3B1* que também são, normalmente, encontrados em Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Síndromes Mielodisplásicas (SMD) e Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) (BARCELLINI; GIANNOTTA & FATIZZO).

1.2.1 Leucemia Mieloide Aguda

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é doença clonal, originária no tecido hematopoiético, caracterizada por um distúrbio proliferativo de células progenitoras da linhagem mieloide. Este distúrbio, acarreta numa insuficiência na produção de células sanguíneas maduras normais, é, frequentemente, acompanhada de neutropenia, anemia e plaquetopenia (SWAMINATHAN & WANG, 2020). Os mecanismos que induzem a célula progenitora, de linhagem mieloide, a perder o controle de proliferação celular, ocasionando na expansão do clone leucêmico, permanece incerto, no entanto, a ativação de proto-oncogenes e genes supressores tumorais aparentam estar envolvidos na patogênese desta doença (EL-SISI et al., 2021).

O procedimento de diagnóstico/prognóstico padrão de LMA depende de vários fatores. Citogenética e perfil mutacional permitem uma estratificação da LMA em subgrupos prognósticos, associados à diferença de significância à Remissão Completa (RC), taxas de relapso e sobrevivência geral; além de características genéticas das células leucêmicas que têm sido, cada vez mais, usadas para guiar novas abordagens para tratamentos (PAPAEMMANUELI, 2016). Entre as alterações cromossômicas mais frequentemente encontradas em leucemias, são as do tipo translocações e inversões. Dentre as LMAs, comumente, são observadas as alterações citogenéticas t(8;21); inv(16) ou t(16;16), t(15;17)

e diversas alterações envolvendo o cromossomo 11 (MEDINGER, 2017; MARTELLI et al., 2013).

Por esses motivos, a caracterização dos perfis (molecular, cromossômico e fenotípico) para a Leucemia Mieloide Aguda é essencial para um diagnóstico precoce e para alinhar estratégias alvo a fim de aumentar o tempo de sobrevida e minimizar negligências no tratamento (DÖHNER, 2017; VOIGT, 2013). Outra técnica que pode ser usada para o estudo e avanço terapêutico da LMA (alvo desse estudo) é a análise experimental de culturas de linhagens celulares HL-60, objetivando a simulação a ação *in vitro* de fármacos e terapias moleculares.

1.2.2 Linhagem HL - 60

A linhagem HL – 60, originária de uma paciente com Leucemia mieloide aguda (LMA) (COLLINS et al., 1977), representam, majoritariamente, promielócitos que podem ser induzidos à diferenciação terminal *in vitro*. Alguns reagentes podem induzir à diferenciação dessas células em granulócitos, monócitos/macrófagos.

A cultura de células leucocitárias do sangue periférico desta paciente, em meio condicionado, resultou no desenvolvimento de uma linhagem celular imortal com fator de crescimento independente, com características mieloides distintas. Algumas das características da linhagem HL-60, fizeram esta linhagem atrativa para estudos de diferenciação celular em geral e de diferenciação celular mieloide (BIRNIE, 1988; MANDA-HENDZLIK et al., 2018).

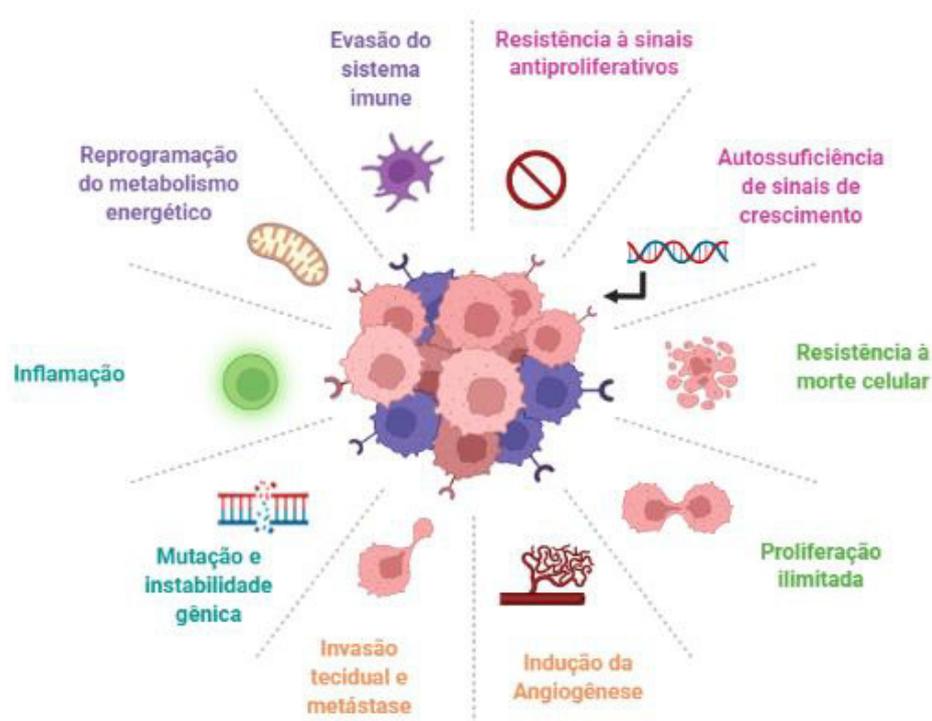
Células de HL–60 crescem em suspensão, num tempo de duplicação que varia entre 20h e 45h, dependendo do subtipo. Todas as sublinhagens apresentam características morfológicas mieloblástica/promielótico: células grandes, núcleo arredondado (contendo de 2-4 nucléolos bem distintos) e um citoplasma basofílico, com grânulos azurófilos, além de apresentar cariótipos com muitas alterações em análises citogenéticas (YU, LIU & GU, 2021).

1.3 Marcas Celulares e Moleculares do Câncer (*Hallmarks* do Câncer)

Hanahan e colaboradores definiram 6 habilidades biológicas que seriam necessárias para o desenvolvimento de neoplasias, devido ao câncer adquirir diversas características de diferenciação durante o seu processo de evolução e progressão oncogênica, chamadas Marcas registradas (*hallmarks*) do câncer. Estas, podem ser, inicialmente, categorizadas em 6 habilidades biológicas: (1) Resistência à sinais antiproliferativos; (2) Autossuficiência de sinais de crescimento; (3) Resistência à morte celular; (4) Proliferação ilimitada; (5) Indução da angiogênese e (6) Invasão tecidual e metástase (WEINBERG & HANAHAN, 2000).

Com o passar dos anos, e aumento no número de estudos nesta área, propôs-se um aprimoramento desse conceito em 2011. A partir disso, foram apresentados 4 novos marcadores: (7) Mutação e instabilidade genética; (8) Inflamação; (9) Reprogramação do Metabolismo Energético e (10) Evasão do Sistema Imune (HANAHAN & WEINBERG 2011). Como já dito anteriormente, o microambiente tumoral consiste numa região extremamente complexa e propícia para o desenvolvimento destes marcadores (Figura 4).

Figura 4: As Marcas celulares e moleculares (*hallmarks*) do câncer (Hanahan, 2011).



Fonte: Elaborada pelo autor

Conhecer a aplicação de cada um desses *Hallmarks* é essencial para o estudo e desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos no campo da medicina oncológica. Sabendo que os compostos capazes de agir como inibidores desses marcadores pertencem a diferentes classes bioquímicas e alguns atuam na inibição de citocinas como: PARP, VEGFR, HGF/c-MET e CDKs, os quais já possuem representantes na clínica oncológica regulamentados e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration). Cada qual com apresenta características farmacológicas e mecanismos de ação próprios e específicos, a fim de desenvolver e possibilitar seu uso em terapias multialvo (NAGINI, 2017).

Dentre os 10 Hallmarks apresentados, metade possui fármacos aprovados em onco-terapias alvo-dirigidas, enquanto que os restantes todos possuem compostos com estudos em estágio avançado. Quando se avalia alguns desses *hallmarks*, observa-se que muitas classes de compostos antineoplásicos, que atuam sobre a inibição da telomerase, podem representar estratégias importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (YASWEN et al., 2015; SAYGIN, 2020). O Vemurafenib (Zelboraf®), por exemplo, age ligando-se, seletivamente, ao no sítio de ligação do ATP da BRAF (V600E), inibindo sua atividade e reduzindo a proliferação celular tumoral (Dunn et al., 2019).

Tabela 1: *Hallmarks* e terapias alvo-dirigidas para o tratamento do câncer.

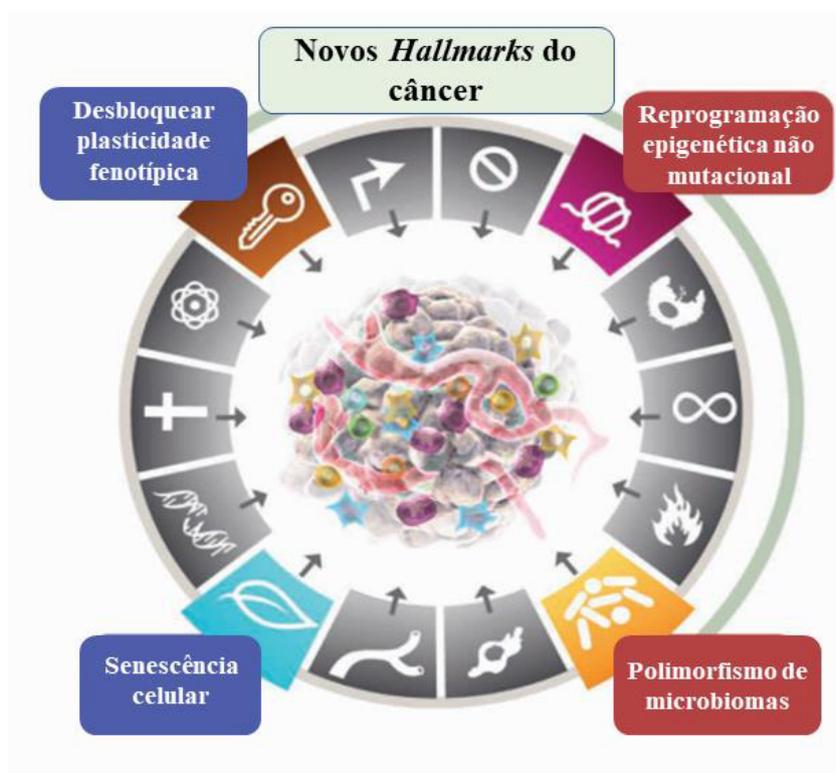
HALLMARK	MOLÉCULAS ALVO	FÁRMACO	STATUS FDA
Autossuficiência de sinais de crescimento	Inibidor de EGFR	Cetuximab	Não
Reprogramação Energética	Inibidor de glicólise Aeróbica	Daporinad	Não
Resistência à morte	BH3 miméticos	ABT 737	Não
Instabilidade genômica e mutação	Inibidores PARP	Olaparib	SIM (Lynparza®)
Angiogênese	Inibidores da sinalização VEGF	Tivozanib	SIM (Fotvida®)
Invasão tecidual e metástase	Inibidores de HGF/c-MET	Vemurafenib	SIM (Zelboraf®)
Inflamação	Compostos anti-inflamatórios seletivos: AINEs ¹ Inibidor COX2 ² Corticoides ³	Aspirina ¹ Celecoxib ² Dexametazona ³	SIM ¹ SIM ² (Celebrex®) SIM ³
Proliferação ilimitada	Inibidores de telomerase: Inibidor de oligonucleotídeo	Imetelstat ¹	NÃO
Evasão do sistema imune	Ativação imune de	Ipilimumab	Não

	anticorpos anti CTLA4		
Resistência à sinais antiproliferativos	Inibidores de ciclinas dependente de quinases (CDK)	Palbociclib	SIM (Ibrance®)

Fonte: Adaptado de Luciano, 2019

Com a progressão do conhecimento a respeito dos mecanismos de atuação do câncer, emergiram outras facetas da doença que possibilitaram um refinamento quanto a sua caracterização e definição. Com isso, “Desbloquear a plasticidade fenotípica” e “Senescência celular” aparecem como *hallmarks* emergentes. Enquanto o “Polimorfismo de microbiomas” e “Reprogramação epigenética não-mutacional”, ambas constituem características particulares capazes de propiciar a aquisição de patamar de *hallmark* (Figura 5) (HANAHAN, 2022).

Figura 5: Novos *Hallmarks* do câncer. *Hallmarks* emergentes e Características Particulares inseridas aos antigos 10 *hallmarks*. (Hanahan, 2022)



Fonte: Adaptado de HANAHAN, 2022

Evidências crescentes, suportam a proposição que alterações em análises epigenéticas podem contribuir para a aquisição de marcadores durante o desenvolvimento e progressão oncogênica. Em adultos, por exemplo, alterações em genes envolvendo respostas de longa

duração e modificações nas histonas, na estrutura da cromatina, desencadeiam alterações que resultam em transformações epigenéticas. Alguns exemplos disso são: Reprogramação epigenética de mecanismos microambientais, Regulação epigenética heterogênea e regulação epigenética de populações de células do tipo estroma em microambientes tumorais (HANAHAN, 2022; DARWICHE, 2020).

1.4 Epigenética e Câncer

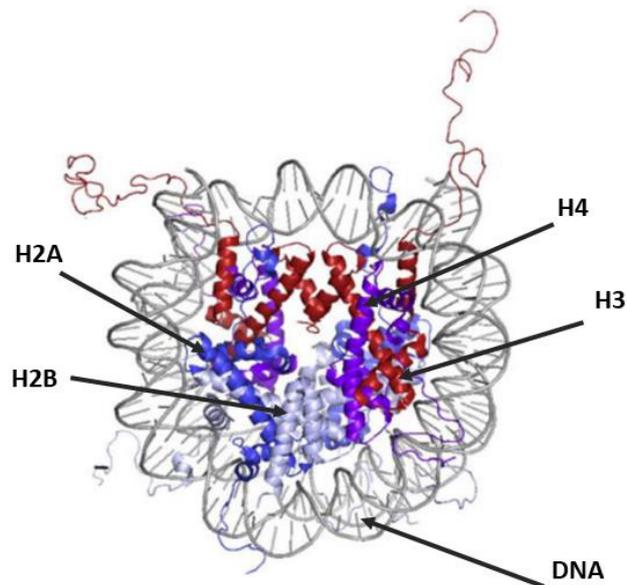
Já é sabido que, fatores de risco como exposição ocupacional ao benzeno e à radiação e hereditariedade, podem acarretar em mutações no DNA e, conseqüentemente, no desenvolvimento de neoplasias. No entanto, também podem ocorrer interações entre fatores de risco e material genético, levando a alterações no padrão de expressão gênica, sem que haja alteração na sequência de nucleotídeos em propriamente dita (mutação). A modificação na expressão genica, sem alterações na sequência de DNA é conferida pelos mecanismos epigenéticos modificam a estrutura da cromatina para um estado mais (eucromatina) ou menos acessível (heterocromatina) aos fatores de transcrição (BOŠKOVIĆ, 2018).

O interesse no campo da epigenética têm crescido exponencialmente desde que foi descrito por Conrad Waddington no início da década de 40 (DEANS & MAGGERT, 2015). Inicialmente, o interesse de Waddington estava na regulação gênica e relações entre genótipo e fenótipo (WADDINGTON, 1942). Já outros pesquisadores, como Nanney (1957) e Lederberg (1958), tinham interesses mais inclinados para a estabilidade dos mecanismos de expressão e herança celular. Por controlar o crescimento e desenvolvimento celular, os mecanismos epigenéticos tem importante papel no processo de carcinogênese, em que as epimutações podem conduzir a uma reprogramação aberrante e inativação de supressores tumorais ou ativação de proto-oncogenes, dentre outras vias relacionadas (ILANGO et al., 2020; MIRANDA FURTADO, 2019).

As modificações genéticas, como mutações e variações no número de cópias, bem como as alterações epigenéticas contribuem para a alteração da expressão gênica, e estão relacionadas a diversos processos biológicos, regulando etapas importantes da divisão celular e progressão neoplásica. Em cânceres humanos, mudanças epigenéticas como metilação de DNA, modificação de histonas e os RNAs não codificadores (ncRNAs) atuam remodelando a cromatina, conferindo um programa especial de expressão genica tempo e espaço específico (LLANGO et al., 2020).

Tais modificações ocorrem, a nível celular, na cromatina, uma organela composta por um complexo estrutural DNA-proteico que se localiza no interior do núcleo, tendo como seu elemento base o nucleossoma. O nucleossoma é constituído por oito moléculas de histonas centrais (octâmero), um par de H2A, H2B, H3 e H4, e rodeadas por 147 pares de bases de DNA. Adicionalmente, os nucleossomas são unidos pela ação da H1 (Figura 6) (HUANG et al., 2020). As interações com essas proteínas permitem que a cromatina assumam as formas de heterocromatina (condensada), que constituirá a estrutura do cromossomo e eucromatina (descondensada), sendo a forma geneticamente ativa (HAUER, 2017).

Figura 6: Estrutura do Nucleossomo. O cromossomo constitui-se de um complexo DNA-Proteínas que permite uma conformação organizacional compacta do material genético (DNA). Em azul escuro: H2A; em azul claro: H2B; em roxo H4; em vermelho H3 e em cinza DNA.



Fonte: Adaptado de CECIL, 2016

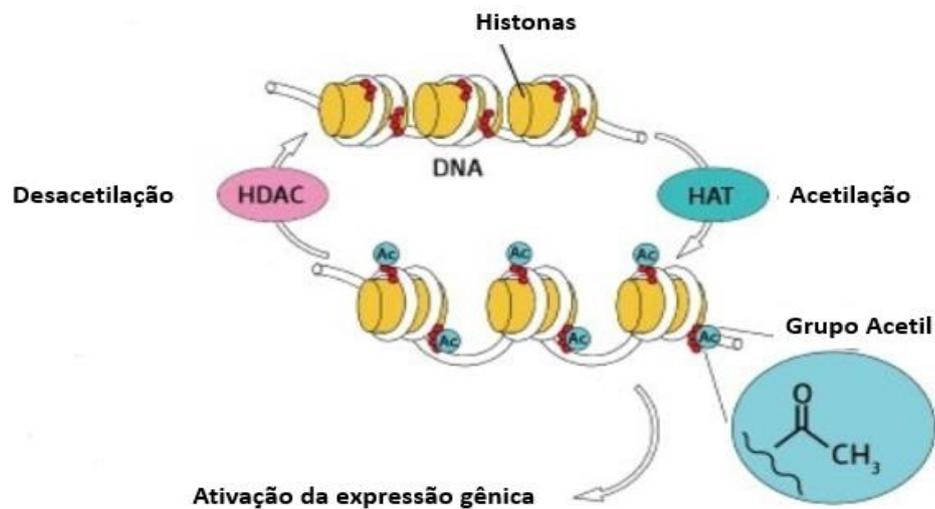
Atualmente, sabe-se que modificações epigenéticas estão, intrinsicamente, relacionadas a alterações na cromatina e, conseqüentemente, nos padrões de expressão gênica, sem interferir na sequência de nucleotídeos. Por conseguinte, alguns genes podem ser silenciados ou expressos reversivelmente (TOPPER et al., 2020).

Modificações pós-traducionais das proteínas histonas, ocorrem na cauda de aminoácidos, devido a adição de grupos funcionais, desencadeadores dos processos de: acetilação, desacetilação, metilação, fosforilação, glicosilação e ubiquitinação (HAN et al.,

2018). Essas modificações desencadeiam uma mudança na conformação da cromatina e da afinidade das proteínas histonas pelo DNA. Dentre elas, a acetilação de histonas está relacionada a ativação transcricional, sendo, frequentemente, associada aos processos oncológicos de: progressão do ciclo celular, recombinação e reparo de DNA e apoptose. Além disso, a regulação da sua expressão está associada a carcinogênese, tendo influência, assim, no processo de formação e progressão tumoral (CHRUN, MODOLO & DANIEL, 2017).

A acetilação, refere-se adição do grupo funcional (R-COCH₃) que confere carga negativa, geralmente associada ao aminoácido lisina, na extremidade N-Terminal da cauda das histonas, de carga positiva. Este processo neutraliza a carga da cauda N-Terminal e diminui a afinidade entre as histonas e a molécula de DNA, favorecendo a ação dos fatores de transcrição. Já na desacetilação, acontece a remoção desse grupo da cauda N-terminal, desencadeando na protonação do grupo amino (carregando-o positivamente). Tal processo que reforça a interação entre Histonas e DNA, favorecendo a condensação da cromatina e repressão dos fatores de transcrição (Figura 7). Estes processos são controlados por duas enzimas principais, as histona acetil transferase (HAT), que adicionam grupos acetil nas histonas, e as histona desacetilase (HDAC) que remove os grupos acetil num processo ativo de desacetilação (NEGANOVA, 2020). Outros grupos de proteínas podem promover a acetilação e desacetilação das histonas, como a EP300, dentre outras, e a desacetilação pode ocorrer ainda de maneira passiva durante a replicação do DNA ou pelas alterações ambientais.

Figura 7: Processo de acetilação e desacetilação de histonas. Na acetilação, ocorre a adição do grupo acetil, à cauda N-terminal das histonas, acarreta numa diminuição da interação entre as histonas e o DNA, permitindo a ação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, a expressão gênica. Já na desacetilação, esses grupos são removidos, aumentando a força de interação DNA-histona, impedindo a ação dos fatores de transcrição.



Fonte: Adaptado de Creative-Biogen, 2018.

Modificações epigenéticas desempenham papel fundamental durante o processo de diferenciação e desenvolvimento celular em decorrência da identificação de uma variedade destas alterações em patologias humanas, principalmente no câncer. Tais alterações, vem sendo estudadas a fim de não apenas entender mecanismos de regulação epigenéticos, mas também guiar o desenvolvimento de novas terapias no tratamento do câncer (LLANGO et al., 2020). Diversas HDACs foram descritas na literatura, correspondendo atualmente a 18 HDACs, as quais são importantes marcadores oncológicos e alvos terapêutico no tratamento do câncer.

1.5 HDAC – Histonas Desacetilases

Ademais de mutações gênicas, a desregulação de mecanismos epigenéticos, mediados por histonas acetil transferases (HAT) e histonas desacetilases (HDACS), fazem parte dos principais fatores adjacentes ao câncer (LI et al., 2018; HANAHAN, 2022). Os processos de acetilação e desacetilação são mecanismos bastante equilibrados em células normais, todavia, modificações em seus padrões de expressão podem acarretar em diversas patologias. A hipoacetilação, desencadeada por uma aberrante ação das HDACs, desempenha, função crucial na carcinogênese, alterando sua expressão gênica e o fenótipo celular (LI & SETO, 2016).

Tais enzimas estão envolvidas em diferentes estágios do câncer. A super expressão das HDACs clássicas (1, 2 e 4) tem sido relacionadas com a uma variedade de patologias, incluindo tumores sólidos e hematológicos (LI et al., 2018). Na maioria dos casos, elevados níveis de HDACs estão associados com doenças em estágios avançados e prognósticos desfavoráveis. Por exemplo, altas expressões de HDAC1, 2 e 3 estão associadas a prognósticos desfavoráveis

em cânceres gástrico e de ovário (SUDO et al., 2008) e altas expressões de HDAC8 correlaciona-se a estágios avançados e baixa sobrevivência in neuroblastomas (RETTING et al, 2015). Podendo, com isso, ser considerado um biomarcador nessas patologias.

A busca por biomarcadores precisos para o tratamento de cânceres tem dominado grande parte das pesquisas oncológicas no decorrer das últimas décadas, em resposta ao massivo impacto na saúde. (COSTA-PINHEIRO, 2015). Os mecanismos pelos quais cada HDAC regulam a carcinogênese são bem diversos. Em decorrência deles, HDACs induzem a um espectro de modificações em níveis celular e molecular, através da hiperacetilação de histonas e proteínas não histonas. HDACS podem tanto agir como genes supressores de tumor tanto quanto regular a modificação via oncogênica célula-sinalização, por meio da modificação de moléculas chave (MIRANDA et al., 2019).

Até o momento, foram descobertas 18 HDACs humanas, as quais foram divididas em 4 classes. Enzimas tipo Rapd3 de Classe 1 compreendem as HDACs: 1, 2, 3 e 8; as Enzimas tipo Hdal-1 de Classe 2, posteriormente, foram subdivididas em 2 subclasses: 2a (HDACs 4, 5, 7 e 9) que são encontradas tanto no citoplasma quanto no núcleo e 2b (HDACs 6 e 10) exclusivas do ambiente citoplasmático. As enzimas Sir2 de Classe 3 consistem em um grupo de 7 Sirtuínas (SIRT1-SIRT7), que são proteínas deacetilase NAD-dependentes e/ou ADP ribosilases. Por fim, a Classe 4 contém, apenas, a HDAC 11, que apresenta similaridade gênica com as proteínas de classe 1 e 2 (Tabela 2) (CHRUN, MODOLO & DANIEL, 2017).

Tabela 2: Descrição das Classes de HDACs

CLASSES	HDACs
Classe 1	HDAC 1, 2, 3 e 8
Classe 2	HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10
Classe 3	Sirtuínas (SIRT 1 – 7)
Classe 4	HDAC 11

Fonte: Elaborada pelo autor

Sua função no câncer, a partir da desacetilação de histonas e proteínas não-histonas, as quais estão envolvidas em na regulação do ciclo celular, apoptose, resposta a danos no DNA, metástase, angiogênese, autofagia e outros processos celulares, já estão bem estabelecidas (VAINCHENKER & KRALOVICS, 2016). Quanto à terapêutica, anteriormente, haviam estudos utilizando bis-acetamida hexametileno (HMBA), tendo resultados mais satisfatórios que seu antecessor (dimetilsulfóxido – DMSO). Todavia, por mais que ele apresentasse mudanças nos padrões de expressão e crescimento celular, a potência do fármaco (EC₅₀) ainda estava na casa do milimolar e os alvos e mecanismos moleculares específicos não eram bem

estabelecidos (MCCLURE et al., 2018). Mesmo com sua aprovação para ensaios clínicos em Síndrome mielodisplásica e Leucemia mieloide aguda, os resultados obtidos foram apenas marginais e respostas transitórias ao tratamento (ALFREEFF, 1992). Com a identificação e clonagem de HDACs humanas e a rápida aprovação do Vorinostat (Zolinza®) para o tratamento de linfoma cutâneo de células T (LCCT), o campo de pesquisa das HDACs tem crescido consideravelmente (MCCLURE et al., 2018). Interessante ressaltar que, apesar de ter sido “molde” para o desenvolvimento do Vorinostat, HMBA não consegue inibir HDACs e, mesmo depois de 2 décadas de pesquisa, os potenciais alvos de HMBA continuam indeterminados. Todavia, a complexidade envolvida nas modificações pós-traducionais da lisina, (MCCLURE et al., 2018)

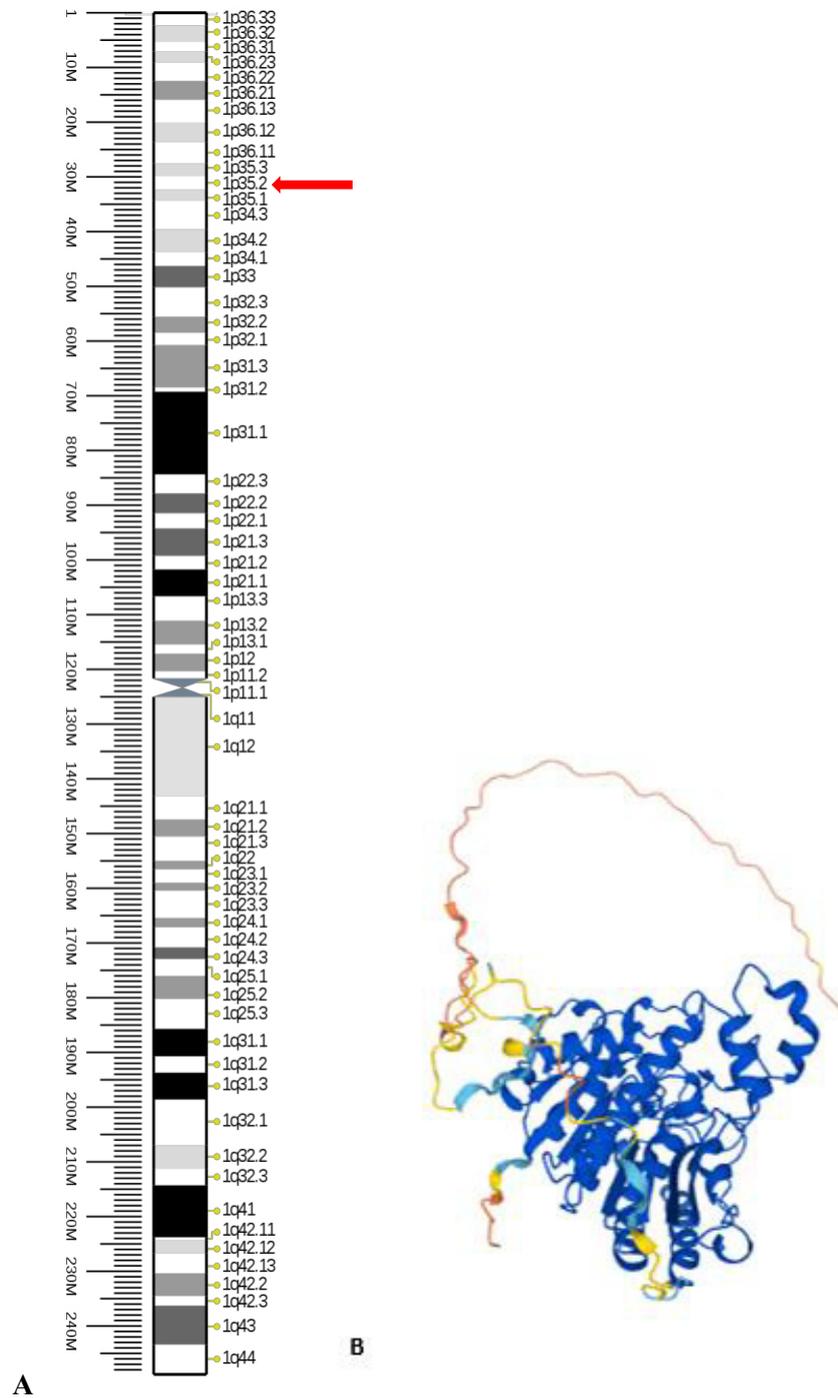
Como mencionado anteriormente, HDACs são enzimas chave na regulação de importantes processos celulares, tais como progressão do ciclo celular e apoptose. Outra forma pela qual HDACs são recrutadas até o DNA são por meio da interação com fatores de transcrição e receptores nucleares (Robertson et al., 2000). Tendo como foco a interação com fatores de transcrição, este estudo analisará a ação de HDAC1 e HDAC2 na modulação epigenética.

1.5.1 HDAC1 – *Histona desacetilase 1*

Histona desacetilase 1 (HDAC1) é uma enzima codificada pelo gene *HDAC1* que, em humanos, localizada no cromossomo 1 (1p35.1) (Figura 8). Interage com a proteína supressora de tumor retinoblastoma (RB1), formando um complexo chave para a regulação de controle da diferenciação e proliferação celular. Associado a isso, proteína associada à metástase 2 (MTA2) promove desacetilação do gene *TP53* e modula seu efeito na apoptose e crescimento celular (KIM et al., 2020).

A utilização deste gene em estudos de modelo animal vem apresentando alternativas para o desenvolvimento de linhagens celulares de camundongos *knockout* base para modelos em diversos modelos (MGI, 2012). Além disso, também é possível analisar o efeito de deleção desse gene em camundongos adultos sob triagem fenotípica. Em descendentes com mutações homocigóticas, detectados ainda durante a gestação, nenhum deles sobreviveu até o desmame. Já em heterocigotos, os indivíduos conseguiram chegar à idade adulta, mas com significantes alterações (SHARNES et al., 2011; GERDIN, 2010).

Figura 8: (A) Posição física do gene *HDAC1* no genoma humano (1p35.2-p35.1) e (B) conformação tridimensional da proteína HDAC1.



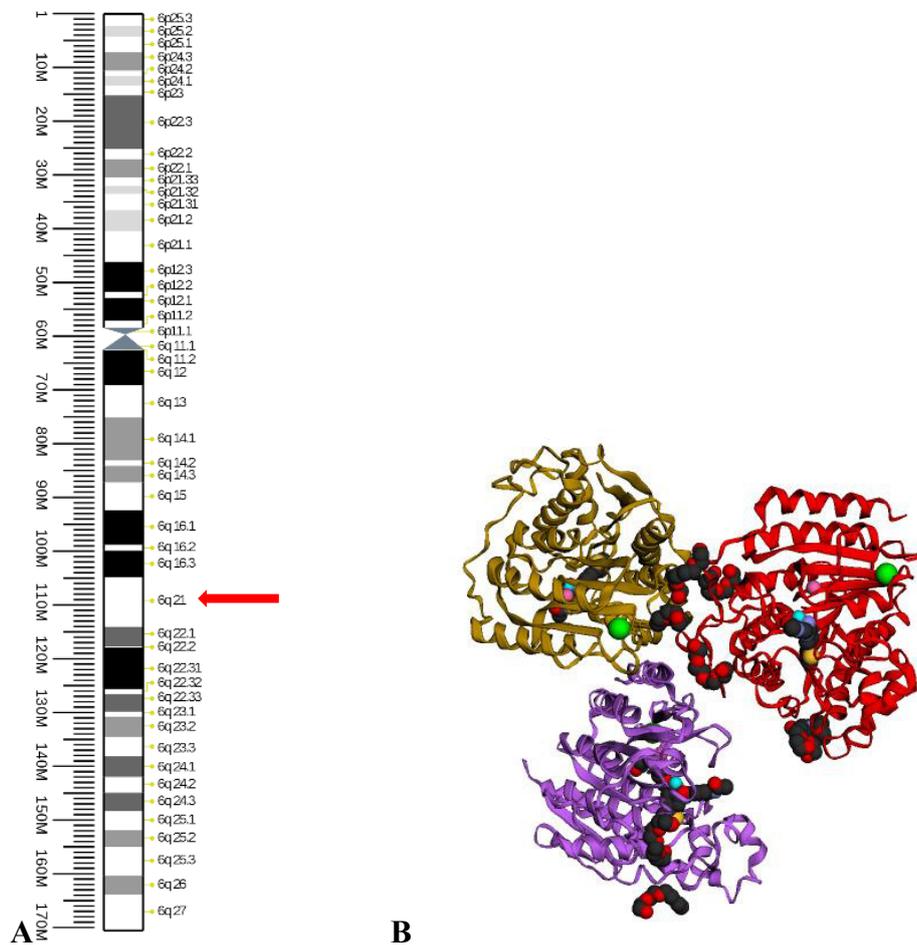
Fonte: Adaptado de STING, 2022.

1.5.2 HDAC2 – *Histona desacetilase 2*

Pertencente à classe das histonas desacetilase 1, a HDAC2 (Figura 9) é sintetizada pelo gene *HDAC2*, localizado no cromossomo 6 (6q21) (BETZ et al., 1998). Além de participar da acetilação de resíduos de lisina na região N-terminal das histonas e, por esse motivo, é, frequentemente, considerado como um importante alvo em estudos de terapia oncogênica.

Apesar de sua interação com as histonas ser amplamente estudado, os mecanismos moleculares que regulam essa via ainda não estão bem estabelecidos. Sabe-se que ela é, majoritariamente, regulada pela proteína quinase 2 (CK2) e proteína fosfatase 1 (PP1), mas análises bioquímicas sugerem que sua regulação seja mais complexa, visto sua coexistência em outros complexos proteicos (SETO & YOSHIDA, 2014). Algumas das doenças a qual ela está relacionada são: Hipertrofia cardíaca (RAGHUNATHAN et al., 2017), Alzheimer (WOOD, 2017), LMA (CONTE et al., 2019), osteosarcoma (LI et al., 2019), câncer de estômago (SUN et al., 2019) e Parkinson (PARK et al., 2016)

Figura 9: (A) Posição física do gene *HDAC2* no genoma humano (6q21) e (B) conformação tridimensional da proteína HDAC2.



Fonte: Adaptado de STING, 2022.

1.6. Inibidores de Histonas Deacetilases (iHDAC)

Os inibidores de histona deacetilase (iHDAC) são compostos químicos que tem a capacidade de bloquear a atividade das HDACs resultando em um acúmulo de acetilação nas proteínas histonas (hiperacetilação), especialmente nos resíduos de lisina (FEDERICO & BAGELLA, 2011). A avaliação desses inibidores, não só acelerou a compreensão das funções dessas enzimas como apresentou-se como um tipo de terapia epigenética promissora para tratamentos oncológicos (DERR et al., 2014; GUO et al., 2018). No câncer de mama, por exemplo, eles podem afetar a mitose celular, bloquear a formação do fuso mitótico e impedir a abscisão durante a citocinese, induzindo as células à apoptose (CHATTERJEE, 2013).

A nível de estrutura química os iHDAC são divididos em 4 grupos:

Hidroxamatos/Ácido Hidroxâmico, Benzamidas, Ácidos Graxos de cadeia curta e Peptídios cíclicos (GUO et al., 2018). A maioria dessas moléculas vem sendo desenvolvida como agentes anticâncer com especificidade e eficiência variadas, propriedades farmacocinéticas e características toxicológicas (LI & SATO, 2016).

Tabela 3: Descrição dos fármacos inibidores de HDAC e suas características.

iHDAC	Especificidade	Tipos de Câncer	Estado Clínico
Ácido Hidroxâmico			
Vorinostat (SAHA)	Classes I, II e IV	LCCT	Aprovado pelo FDA em 2006
Belinostat (Beleodaq/PXD101)	Classes I, II e IV	LCTP	Aprovado pelo FDA em 2014
Panobinostat (LBH-589)	Classes I, II e IV	MM	Aprovado pelo FDA em 2015
Resminostat (4SC-201)	Classes I e II	Colorretal avançado e carcinoma hepatocelular; LH	Ensaio de fase II
Givinostat (ITF2357)	Classes I e II	LLC, MM e LH	Ensaio de fase II
Pracinostat (SB939)	Classes I, II e IV	LMA	Ensaio de fase II
Abexinostat (PCI-24781)	Classes I e II	Tumores Sólidos Metastáticos; LH; LNH; LLC	Ensaio de fase I
Quisinostat (JNJ-26481585)	Classes I e II	Tumores sólidos avançados, Linfomas, LCCP	Ensaio de fase I e II
MPT0E028	HDAC1, 2, 6	Tumores sólidos avançados	Ensaio de fase I
CHR-3996	Classe I	Tumores sólidos	Ensaio de fase I
CUDC-101	Classes I e II, EGFR, HER2	Tumores sólidos	Ensaio de fase I
CUDC-907	Classes I e II, PI3K	MM; Linfoma; Tumores sólidos	Ensaio de fase I
Benzamidas			
Entinostat (MS-275)	Classe I	Tumores sólidos e hematológicos	Ensaio de fase I e II
Mocetinostat (MGCD0103)	Classe I e IV	Tumores sólidos e hematológicos	Ensaio de fase I e II
Tacedinaline (CI-994)	Classe I	MM, Pulmão e câncer de pâncreas	Ensaio de fase II e III

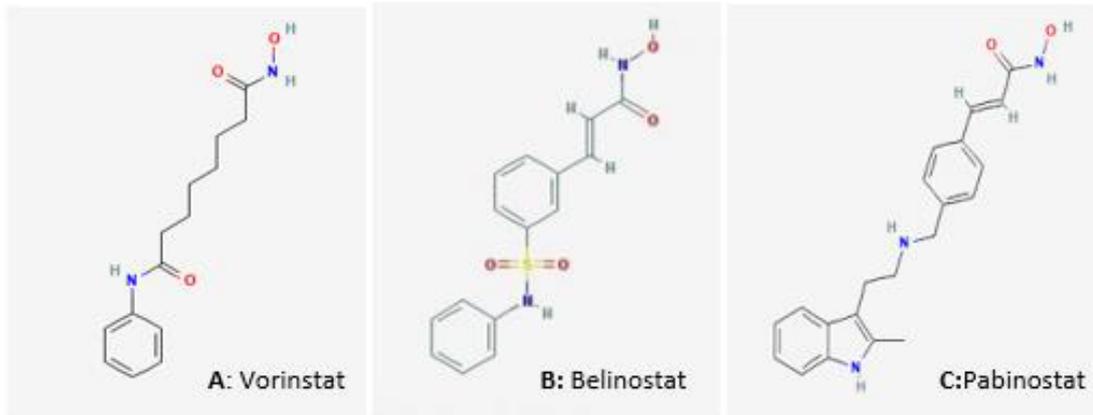
Ricolinostat (ACY-1215)	HDAC6	MM e Linfoma	Ensaio de fase I e II
Chidamide (CS055/ HBI-8000)	HDAC1, 2, 3, e 10	Câncer de mama; CPCNP	Ensaio de fase II e III
Peptídeos Cíclicos			
Romidepsin (Depsipeptide/ FK228)	Classe I	LCTC; LCTP	Aprovado pelo FDA em 2009 e 2011
Ácido graxos de cadeia curta			
Ácido Valproico	Classes I e II	Tumores sólidos e hematológicos	Ensaio de fase I e II
Fenilbutirato	Classes I e II	Tumores sólidos e hematológicos	Ensaio de fase I e II
AR-42	Classes I e II b	LMA	Ensaio de fase I
Pivanex (AN-9)	Classes I e II	CPCNP; Mieloma. LLC	Ensaio de fase II

Legenda: LCCT: linfoma cutâneo de células T, LCCP: linfoma cutâneo de células periféricas, MM: mieloma múltiplo, LH: linfoma de Hodgkin, LMA: leucemia mieloide aguda, LLC: leucemia linfóide crônica, LNH: linfoma não Hodgkin, CPCNP: câncer pulmonar de células não-pequenas. Fonte: Adaptado de LI & SATO, 2016.

Os hidroxamatos, alvo desse estudo, estão entre os compostos mais estudados dentro das epidrogas, Hidroxamatos. A descoberta de novas drogas derivadas desta classe, apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, conduzindo a diversas aplicações terapêuticas. Estas propriedades biológicas podem ser explicadas pela sua capacidade de quelar metais na presença de 2 átomos de oxigênio. Esta característica, relaciona-se a atividades antioxidantes, desintoxicantes de metais e antimicrobianas (BERTRAND et al., 2013). Todavia, o ácido hidroxâmico tem capacidade inibitória em metaloenzimas, com atividade antimicrobianas, anti-inflamatórias e antitumorais. (BLANQUART, 2019).

A classe dos hidroxamatos está entre os principais compostos investigados no campo da epigenética, onde apresenta o maior número de representantes de epidrogas na clínica. Dentre quatro drogas dessa classe aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration) três delas atuam como inibidores de HDACs: Vorinostat, Panobinostat e Belinostat (Figura 11), no qual apresentam resultados promissores com alta toxicidade (MIRANDA FURTADO et al., 2019). Os ácidos hidroxâmicos são uma classe de compostos orgânicos, tendo como característica o grupo funcional $R-C(=O)-N(OH)R'$, podendo conter, em seus radicais, outros fragmentos de compostos orgânicos (YAZBECK, 2015; KENNY et al., 2020).

Figura 10: Principais representantes do hidroxamatos: (A) Vorinostat; (B) Belinostat; (C) Pabinostat.



Fonte: Adaptado de PubChem, 2022.

Atualmente, a maioria dos inibidores de HDAC aprovados pelo FDA são para tratamentos de Linfomas, Linfoma de células T cutâneo (LCTC) e Linfoma de células T Periféricas (LCTP). Os inibidores de histona deacetilases (HDAC), encontram entre os principais compostos aprovados pelo FDA para tratamento do câncer, os quais apresentam resultados promissores com alta seletividade e baixa toxicidade. Dentre eles o Vorinostat e a Romidepsin, são utilizados no tratamento do linfoma cutâneo de células T, e o Pabinostat e Belinostat no tratamento do mieloma múltiplo (QI et al., 2016). O Vorinostat (Ácido Hidroxâmico Suberoilânilida, SAHA), tem mostrado resultados promissores, principalmente quando usado como parte de terapia combinada (HOSHIDA et al., 2010).

Outras drogas inibidoras das enzimas que atuam nas demais modificações de histonas, tais como as histonas acetilases (HATs), metiltransferases (HMTs), demetilases (HDM) e as proteínas ligantes de histonas acetiladas ou metiladas (PAHs and PMHs, respectivamente), tem sido avaliada quanto ao seu potencial terapêutico no tratamento do câncer (DHANAK; JACKSON, 2014; RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011). Deste modo, a busca por novas moléculas, incluindo as classes de droga com modulação epigenética vem apresentando constante interesse pela comunidade científica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial epigenético dos hidroxamatos (LDT565 e LDT566) na modulação da expressão dos genes *HDAC1* e *HDAC2* em linhagem leucêmica HL-60.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a interação *in silico* das proteínas *HDAC1* e *HDAC2* para determinação dos potenciais alvos moleculares
- Analisar o potencial citotóxico dos hidroxamatos (Vorinostat, LDT565 e LDT 566) nas linhagens celulares HL-60.
- Identificar o potencial inibitório dos hidroxamatos sintéticos na expressão dos genes *HDAC1* e *HDAC2*
- Comparar a o potencial de inibição dos hidroxamatos sintéticos (LDT565 e LDT566) e o composto comercial (Vorinostat) na regulação da expressão dos genes *HDAC1* e *HDAC1*.
- Comparar os achados *in silico* com os aspectos patogênicos da Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

3. Metodologia

3.1 Análise *in silico*

As predições *in silico*, das enzimas de interesse, foi realizada, através da análise em plataforma de banco de dados *on-line* (*STRING*, versão 11.5), a fim de avaliar a interação proteína-proteína (IPP) e realizar predições de rotas metabólicas. Em seguida, os dados obtidos foram tabelados e analisados, baseados nos seus valores de Taxa de enriquecimento-p para IPP (interação proteína-proteína) e Taxa de falsa descoberta. A rede de interações foi construída a partir de um *score* de 0,4 ou superior, usando múltiplas proteínas, e tendo como base o organismo *Homo sapiens* (SZKLARCZYK et al., 2017).

3.2 Análise Celular - Potencial citotóxico dos compostos alvo em linhagem leucêmica.

O perfil citotóxico dos compostos sintéticos dos hidroxamatos foram determinados pelo método do MTT, a fim de avaliar a atividade metabólica *in vitro* (Mosman, 1983). Para tal, a linhagem leucêmica utilizada foi plaqueada em placas de 96 poços incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37° C, na densidade celular (células/mL) de $0,3 \times 10^6$ para a linhagem de origem leucêmica HL-60 em meio específico (RPMI). Foram adicionados às placas os protótipos dos hidroxamatos (LDT565 e LDT566), além do controle positivo iHDAC Vorinostat, em que as concentrações testadas variaram de 0.02 a 160 µM. Ao final de 72h de tratamento, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes removidos e então a avaliação da citotoxicidade utilizando o ensaio MTT (Sigma Aldrich, Missouri, USA) foi realizada. A absorbância foi medida, após dissolução do precipitado com 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Dinâmica) puro, em espectrofotômetro (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) no comprimento de onda de 595nm. A leitura foi realizada utilizando o programa Multimode Detection Software (Beckman Coulter Inc.).

3.3 Análise Molecular

A análise da expressão genica foi realizada para identificar o potencial de iHDAC dos hidroxamatos LDT565 e LDT566 dos genes *HDAC1* e *HDAC2* em linhagem de células leucêmicas HL60 após 12h e 24h de tratamento. O RNA total foi isolado por meio do *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre, Illumina company, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, a concentração de cada amostra de

RNA obtida após a quantificação por espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

3.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Tendo como molde o RNA total, a síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada com o *High capacity cDNA Synthesis Kit* (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. Para excluir contaminação por DNA, foi realizada uma transcrição reversa negativa (RT-), sem a adição da enzima transcriptase reversa. O cDNA fita simples foi estocado à -20°C até o momento do uso. Para a análise da expressão dos genes *HDAC1* e *HDAC2* foi utilizada a metodologia de RT-qPCR (Transcrição reversa associada a PCR quantitativo em tempo real) utilizando como sistema de detecção de sequências o CFX96 Touch Real-Time PCR (BioRad) com o PowerUp Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). Para o desenho dos primers foi utilizado o programa Primer3 de acordo com sequências depositadas no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como genes referência, foram utilizados os genes *GAPDH* e *ACTB*. A expressão relativa dos alvos analisados foi calculada utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_q}$ descrito por Livak e Scmittgen (2001).

Tabela 4: Sequências dos *primers* utilizados.

Genes	<i>Primers</i>	Temperatura de Anelamento (°C)	Pares de base (pb)
<i>HDAC1</i>	F: TTGGAA ██████████ CCCTTATTG	60	130
	R: CCAGT ██████████ TACGAAAA		
<i>HDAC2</i>	F: ATTGGC ██████████ AGCTGATT	60	116
	R: TAGCCAC ██████████ ARACTTCA		

4 RESULTADOS

4.1 Análise *in silico* das proteínas HDACs

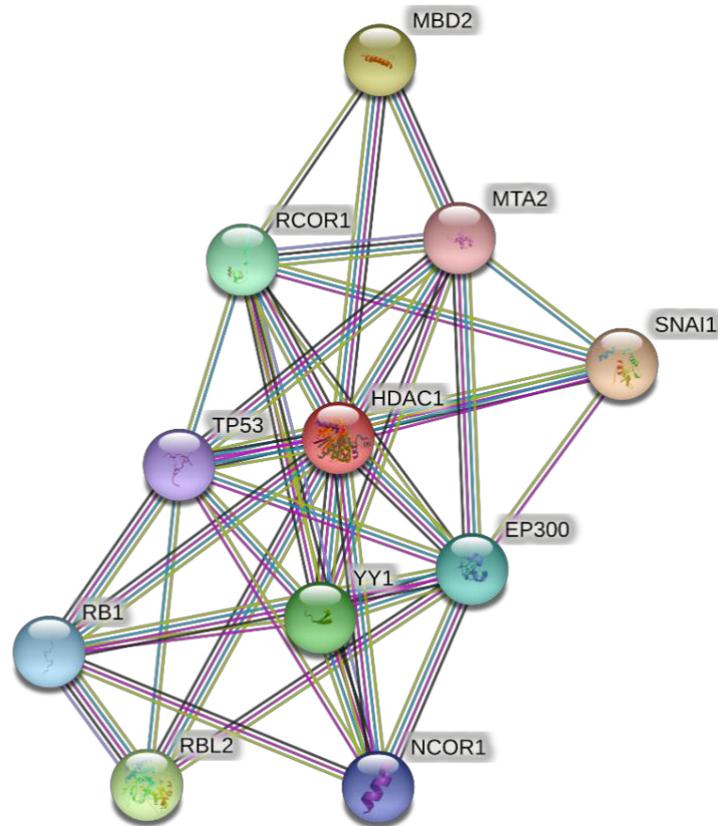
Tendo por base os dados avaliados, uma rede de interação, funcional, para proteínas (HDAC1 e HDAC2) foi construída a partir da base de dados STRING (<https://string-db.org>, version 11.0). Para isso, foi considerado um score de 0,4 ou maior e o organismo *Homo sapiens*, como base, para criar as correlações proteicas. Para isso, foram selecionadas as configurações padrão do site, criando uma rede de interações com 10 proteínas ademais da de interesse. Formando, assim, uma malha de interações com 11 nós (proteínas).

Sendo uma disposição aleatória, os números apresentados nos valores de enriquecimento obtidos demonstraram uma maior interação proteína–proteína (IPP) que o esperado. Com isso, os enriquecimentos indicados demonstram que as proteínas observadas estão, pelo menos, parcialmente conectadas como um grupo. Para HDAC1 (Tabela 5), observa-se que na rede tem-se um total de 11 nós. Destes, o número de alterações obtidos para a matriz foi de 37 (Figura: 12), mais que o dobro de interações esperadas (18). O valor de enriquecimento obtido foi de $7.86e-05$. Quanto as correlações, as com valores mais significantes foram as de HDAC1 com RB1, MDB2, TP53, RBL2 e MTA2 (score 0,999) (Tabela 6). Em relação às análises de Taxa de descoberta falsa (Tabela 7), nos dados Ontologia Gênica (GO), tanto para os processos biológicos quanto funções moleculares foram encontradas significância estatística (considerando os valores de falsa descoberta - VFD) para os seus processos correspondentes.

Tabela 5: Dados sobre a rede de interação da HDAC1

HDAC1	
Número de nós	11
Número de interações esperados	18
Número de interações	37
Valor de enriquecimento-p para IPP	$7.86e-05$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 11: Rede de interações da HDAC1

Fonte: String, 2022

Tabela 6: Interação proteina-proteina e score combinado de acordo com o String para HDAC1.

#Nó 1	#Nó 2	ID-STRING_Nó1	ID-STRING_Nó2	Score combinado
EP300	SNAI1	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000244050	680
EP300	RBL2	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000262133	849
EP300	YY1	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000262238	999
EP300	RCOR1	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000262241	522
EP300	MTA2	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000278823	934
EP300	NCOR1	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000268712	988
EP300	RB1	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000267163	990
EP300	HDAC1	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000362649	999
EP300	TP53	9606.ENSP00000263253	9606.ENSP00000269305	999
HDAC1	SNAI1	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000244050	999
HDAC1	MBD2	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000256429	999

HDAC1	RBL2	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000262133	999
HDAC1	YY1	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000262238	999
HDAC1	RCOR1	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000262241	999
HDAC1	RB1	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000267163	999
HDAC1	NCOR1	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000268712	999
HDAC1	TP53	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000269305	999
HDAC1	MTA2	9606.ENSP00000362649	9606.ENSP00000278823	999
MBD2	RCOR1	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000262241	479
MBD2	MTA2	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000278823	996
MTA2	SNAI1	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000244050	776
MTA2	YY1	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000262238	506
MTA2	RCOR1	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000262241	727
MTA2	TP53	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000269305	979
NCOR1	YY1	9606.ENSP00000268712	9606.ENSP00000262238	906
NCOR1	RCOR1	9606.ENSP00000268712	9606.ENSP00000262241	454
NCOR1	RB1	9606.ENSP00000268712	9606.ENSP00000267163	610
NCOR1	TP53	9606.ENSP00000268712	9606.ENSP00000269305	770
RB1	RBL2	9606.ENSP00000267163	9606.ENSP00000262133	906
RB1	YY1	9606.ENSP00000267163	9606.ENSP00000262238	419
RB1	TP53	9606.ENSP00000267163	9606.ENSP00000269305	990
RBL2	TP53	9606.ENSP00000262133	9606.ENSP00000269305	814
RCOR1	SNAI1	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000244050	993
RCOR1	YY1	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000262238	483
RCOR1	TP53	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000269305	790
SNAI1	TP53	9606.ENSP00000244050	9606.ENSP00000269305	996
TP53	YY1	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000262238	994

Tabela 7: As principais Processos Biológicos e Funções moleculares na rede de interação da proteína HDAC1.

ID dos termos	Descrição dos Termos	Taxa de descoberta falsa
Processo Biológico (GO)		
<u>GO:0034349</u>	Processo apoptótico de células da glia	0.0016
<u>GO:0070933</u>	Desacetilação da histona H4	0.0043
<u>GO:0006346</u>	Metilação do DNA dependente da dissociação da heterocromatina	0.0047
<u>GO:1903799</u>	Regulação negativa na produção de miRNA envolvidos no silenciamento gênico por miRNA	0.0057
<u>GO:0060766</u>	Regulação negativa na via de sinalização de receptores de andrógeno	0.0064
Funções Molecular (GO)		
<u>GO:0004407</u>	Atividade de desacetilação de histonas	0.0098
<u>GO:0001102</u>	Ligação do fator de transcrição de ativação da RNA polimerase II	7.31e-06
<u>GO:0001085</u>	Ligação de fator de transcrição da RNA polimerase II	7.96e-06
<u>GO:0051059</u>	LIGAÇÃO DO NF-KAPPAB	0.0238
<u>GO:0097718</u>	Ligação específica à domínio desordenado	0.0275

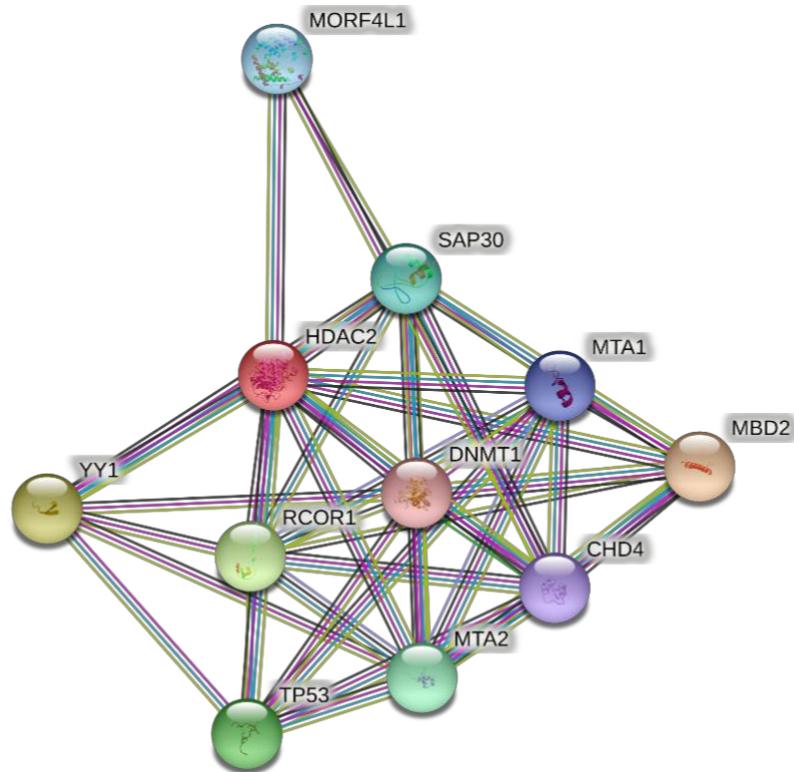
Fonte: Elaborado pelo autor

Para HDAC2 (Tabela 7), observa-se que na rede tem-se um total de 11 nós. Destes, o número de conexões esperadas para as proteínas da matriz era de 15 (Figura: 13), contudo foram observadas 43 interações, quase o triplo do esperado, indicando que, numa análise aleatória, as proteínas desta rede estão, pelo menos, parcialmente biologicamente interligadas como um grupo. O valor de enriquecimento obtido foi de 3.99e-09. Quanto as correlações, as com valores mais significantes foram as de HDAC2 com MDB2, TP53, YY1, MTA1 e MTA2 (score 0,999) (Tabela 9). Em relação às análises de taxa de descoberta falsa (tabela 8), nos dados Ontologia Gênica (GO), tanto para os processos biológicos quanto funções moleculares foram encontradas significância estatística para os seus processos correspondentes.

Tabela 8: Dados sobre a rede de interação da HDAC2.

HDAC2	
Número de nós	11
Número de interações esperados	15
Número de interações	43
Valor de enriquecimento-p para IPP	3.99e-09

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 12: Rede de interações da HDAC2

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Tabela 9: Interação proteína-proteína e score combinado de acordo com o String para HDAC2.

#Nó 1	#Nó 2	ID-STRING_Nó1	ID-STRING_Nó2	Score combinado
CHD4	MBD2	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000256429	978
CHD4	RCOR1	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000262241	831
CHD4	TP53	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000269305	944
CHD4	MTA2	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000278823	999
CHD4	SAP30	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000296504	760
CHD4	MORF4L1	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000331310	447
CHD4	MTA1	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000333633	998
CHD4	DNMT1	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000352516	731
CHD4	HDAC2	9606.ENSP00000349508	9606.ENSP00000430432	999
DNMT1	MBD2	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000256429	966

DNMT1	YY1	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000262238	457
DNMT1	RCOR1	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000262241	540
DNMT1	TP53	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000269305	993
DNMT1	MTA2	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000278823	786
DNMT1	SAP30	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000296504	721
DNMT1	MTA1	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000333633	883
DNMT1	CHD4	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000349508	731
DNMT1	HDAC2	9606.ENSP00000352516	9606.ENSP00000430432	999
HDAC2	MBD2	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000256429	999
HDAC2	YY1	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000262238	999
HDAC2	RCOR1	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000262241	999
HDAC2	TP53	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000269305	999
HDAC2	MTA2	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000278823	999
HDAC2	SAP30	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000296504	999
HDAC2	MORF4L1	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000331310	999
HDAC2	MTA1	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000333633	999
HDAC2	CHD4	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000349508	999
HDAC2	DNMT1	9606.ENSP00000430432	9606.ENSP00000352516	999
MBD2	RCOR1	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000262241	479
MBD2	SAP30	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000296504	713
MBD2	DNMT1	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000352516	966
MBD2	CHD4	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000349508	978
MBD2	MTA1	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000333633	990
MBD2	MTA2	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000278823	996
MBD2	HDAC2	9606.ENSP00000256429	9606.ENSP00000430432	999
MORF4L1	SAP30	9606.ENSP00000331310	9606.ENSP00000296504	571
MORF4L1	CHD4	9606.ENSP00000331310	9606.ENSP00000349508	447
MORF4L1	HDAC2	9606.ENSP00000331310	9606.ENSP00000430432	999
MTA1	MBD2	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000256429	990
MTA1	RCOR1	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000262241	680
MTA1	TP53	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000269305	965
MTA1	MTA2	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000278823	970
MTA1	SAP30	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000296504	690
MTA1	DNMT1	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000352516	883
MTA1	CHD4	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000349508	998

MTA1	HDAC2	9606.ENSP00000333633	9606.ENSP00000430432	999
MTA2	MBD2	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000256429	996
MTA2	YY1	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000262238	506
MTA2	RCOR1	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000262241	727
MTA2	TP53	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000269305	979
MTA2	DNMT1	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000352516	786
MTA2	SAP30	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000296504	813
MTA2	MTA1	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000333633	970
MTA2	HDAC2	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000430432	999
MTA2	CHD4	9606.ENSP00000278823	9606.ENSP00000349508	999
RCOR1	MBD2	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000256429	479
RCOR1	YY1	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000262238	483
RCOR1	DNMT1	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000352516	540
RCOR1	MTA1	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000333633	680
RCOR1	MTA2	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000278823	727
RCOR1	SAP30	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000296504	758
RCOR1	TP53	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000269305	790
RCOR1	CHD4	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000349508	831
RCOR1	HDAC2	9606.ENSP00000262241	9606.ENSP00000430432	999
SAP30	MBD2	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000256429	713
SAP30	YY1	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000262238	998
SAP30	RCOR1	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000262241	758
SAP30	MTA2	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000278823	813
SAP30	MORF4L1	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000331310	571
SAP30	MTA1	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000333633	690
SAP30	DNMT1	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000352516	721
SAP30	CHD4	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000349508	760
SAP30	HDAC2	9606.ENSP00000296504	9606.ENSP00000430432	999
TP53	YY1	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000262238	994
TP53	RCOR1	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000262241	790
TP53	CHD4	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000349508	944
TP53	MTA1	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000333633	965
TP53	MTA2	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000278823	979
TP53	DNMT1	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000352516	993
TP53	HDAC2	9606.ENSP00000269305	9606.ENSP00000430432	999

YY1	DNMT1	9606.ENSP00000262238	9606.ENSP00000352516	457
YY1	RCOR1	9606.ENSP00000262238	9606.ENSP00000262241	483
YY1	MTA2	9606.ENSP00000262238	9606.ENSP00000278823	506
YY1	TP53	9606.ENSP00000262238	9606.ENSP00000269305	994
YY1	SAP30	9606.ENSP00000262238	9606.ENSP00000296504	998
YY1	HDAC2	9606.ENSP00000262238	9606.ENSP00000430432	999

Tabela 10: As principais Processos Biológicos e Funções Moleculares na rede de interação da proteína HDAC2.

ID dos termos	Descrição dos Termos	False Discovery Ratio
Processo Biológico (GO)		
<u>GO:0070933</u>	Desacetilação da Histona H4	0.0078
<u>GO:0010225</u>	Resposta à UV-c	0.0137
<u>GO:0016575</u>	Desacetilação de histonas	1.06e-07
<u>GO:0043153</u>	<i>Entrainment</i> do relógio circadiano por fotoperíodo	0.0254
<u>GO:0048512</u>	Comportamento circadiano	0.0292
Função Molecular (GO)		
<u>GO:0001103</u>	RNA polimerase II reprimindo a ligação à fatores de transcrição	1.79e-05
<u>GO:0004407</u>	Atividade de histona desacetilase	0.0158
<u>GO:0008327</u>	Ligação metil-CpG	0.0329
<u>GO:1990841</u>	Ligação promotor-específica da cromatina	0.0026
<u>GO:0042826</u>	Ligação histona desacetilase	1.79e-05

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

4.2 Perfil citotóxico dos hidroxamatos em linhagem hematológica HL-60.

Os resultados de citotoxicidade, realizados *in vitro*, apresentaram atividade de crescimento inibitório dependente do tempo e concentração analisados para todas as linhagens analisadas. Destas, pode-se evidenciar a atividade citotóxica ao longo do tempo (24, 48 e 72h) para os dois compostos da classe dos hidroxamatos (LDT565 e LDT566) em linhagem de leucemia promielocítica HL-60 (Tabela 11). Quando comparado com o hidroxamatos comercial (Vorinostat) a molécula LDT565 destacou-se, apresentando resultados de IC50 (concentração inibitória) nos tempos de resultados similares de IC50 desde as 24hs de tratamento. Além disso, os resultados mostram que as moléculas testadas são seletivas para linhagem leucêmica através do índice de seletividade, mais uma vez, descartando-se a molécula LDT565.

Tabela 11: Valores de CI50 dos Hidroxamatos (LDT565, LDT566 e Vorinostat) após 24, 48 e 72h tratamento em linhagem hemato-oncológica (HL60) e índice de seletividade (IS) calculado a partir CI50 calculada em linhagem não tumoral (L929).

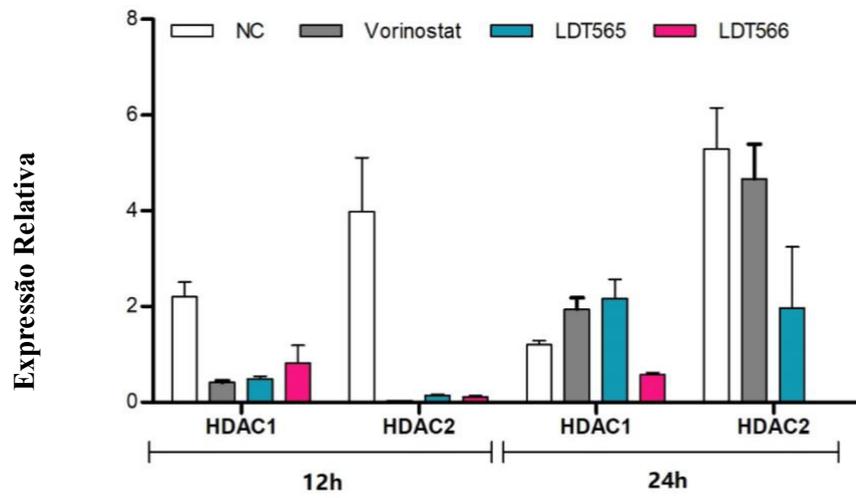
Cell Line /		CI ₅₀ μ M (IC 95%)			IS 72h (CI ₅₀ L929/CI ₅₀ HL60)
		24h	48h	72h	
HL60	Vorinostat	5,84 (4,59-7,42)	1,81 (1,67-1,95)	1,27 (1,12-1,43)	>6,35
	LDT565	1,83 (1,56-2,15)	1,19 (1,14-1,24)	1,43 (1,27-1,64)	10,24
	LDT566	8,63 (7,24-10,31)	2,48 (2,27-2,59)	2,59 (2,42-2,81)	4,90

4.3 Potencial de Modulação Epigenética dos Hidroxamatos.

Os promissores resultados de citotoxicidade das moléculas dos hidroxamatos somado aos dados da literatura, onde descreve sua atividade como inibidores das enzimas histona desacetilases (iHDACs), estando entre os principais moduladores epigenéticos, permitiu-nos avaliar o perfil de modulação da expressão gênica das HDACs induzidas por essas moléculas.

Foram analisados o perfil de expressão dos genes *HDAC1* e *HDAC2* após 12 e 24h de incubação com dois hidroxamatos sintéticos LDT565 e LDT566, comparados ao comercial Vorinostat (SAHA), todos na concentração de 2,5 μ M. Os resultados indicam que todos os compostos reduziram a expressão de *HDAC1* e *HDAC2* em 12h de tratamento. No entanto, após 24h somente o LDT566 parece reduzir a expressão desses genes, ainda que tenha sido observado modificação da expressão de *HDAC1* e *HDAC2* pelos compostos analisados (Figura 15).

Figura 13: Padrão de expressão dos genes HDAC1 e HDAC2 em linhagem HL60 após incubação com hidroxamatos LDT565 e LDT566.



5. DISCUSSÃO

Os compostos sintéticos de Varinostat (LDT565 e LDT566) foram desenvolvidos por pesquisadores da Universidade de Brasília (UnB) com o propósito de ser uma alternativa à sua versão comercial. Com isso, foram realizados diversos experimentos a fim de analisar sua viabilidade como alternativa ao composto aprovado pelo FDA.

Os resultados dos ensaios *in vitro* demonstraram uma citotoxicidade homogênea para todos os compostos, considerando o IC50 em todos os compostos utilizados. Considerando os resultados obtidos nas análises *in silico* e os através de expressão gênica pode-se observar uma perspectiva positiva para novos estudos farmacológicos usando os novos compostos hidroxamatos sintéticos (LDT565 e LDT566), quando comparados a versão comercial (Vorinostat).

Estudos utilizando linhagens celulares K562 (Leucemia mieloide crônica) e PC3 (Adenocarcinoma de próstata), comparando a ação de citotoxicidade dos hidroxamatos utilizados neste estudo, com a linhagem celular HL60 foram encontrados valores de IC50 semelhantes para todas as linhagens celulares. Esta similaridade permite a escolha de quaisquer dessas linhagens celulares para em estudos *in vitro* desses compostos. (LUCIANO et al., 2019).

Quanto as análises de perfil de expressão gênicas de *HDAC1* e *HDAC2* os padrões de inibição de expressão gênica foi diferente para os 3 compostos hidroxamatos. Não obstante, em todos os casos houve inibição de todos os genes no tempo de incubação de 12h, mas apenas o LDT566 parece inibir a expressão gênica após 24h, tornando-o um composto mais favorável a ser aplicado em modelos pré-clínicos. Com relação aos efeitos moleculares, da transcrição do RNA mensageiro (expressão genica) e tradução a proteína, possivelmente os efeitos a nível de expressão genica sejam melhores conservados em um tempo de tratamento mais curto. Assim como o observado nos Valores de IC50.

A modulação da expressão de HDACs, associado com o perfil citotóxico moderado dos hidroxamatos, podem ser, potencialmente, promissores em diversos campos de estudo, incluindo a pesquisa na busca pelo equilíbrio entre potencial farmacológico, citotóxico e vantagens terapêuticas para o tratamento de células com alta capacidade proliferativas como células cancerígenas. Considerando o potencial de inibição em linhagens leucêmicas imortalizadas, os compostos podem representar um potencial terapêutico promissor com uso combinado no tratamento de oncologias hematológicas.

Comparados os dados de expressão obtidos para os genes *HDACs* com as Taxas de

falsa descoberta, vê-se conexões de Ontologia Gênica interessantes, em cada um dos nós das redes proteicas analisadas *in silico*.

Para HDAC1 as mais relevantes foram MBD2, RB1 e TP53. MBD2, referente ao GO de Metilação do DNA dependente da dissociação da heterocromatina (GO:0006346), liga-se a ilhas CpG na região 5' do DNA, desencadeando processos de metilação e, conseqüentemente, silenciamento da expressão gênica. Além disso, também age no recrutamento de Histona Desacetilase (outro processo de silenciamento gênico). Em LMA, uma das mutações mais comuns é a do *DNMT3A*, gene relacionado ao processo de metilação das ilhas CpG implicando na patogênese e prognóstico desfavorável da doença (BECHER et al., 2010).

O RB1, sintetizado pelo gene supressor tumoral *RB*, é a proteína mais importante para o retinoblastoma, auxiliando as células a desacelerarem seu crescimento. Cada célula tem, normalmente, dois genes *RBI*. Enquanto uma célula da retina tem, pelo menos, um gene RB1 funcional, o retinoblastoma não irá se formar. Todavia, quando ambos os genes estão mutados ou ausentes, uma célula pode crescer sem controle, levando a outras alterações genéticas que, por sua vez, podem tornar-se células cancerígenas. Ademais disso, a RB1 é uma proteína chave para a o início da regulação do ciclo celular (promovendo a transição G0-G1) e está, diretamente, envolvido na formação da heterocromatina, manutenção da sua estrutura e metilação de histonas (HURWITZ; SHIELDS & SHIELDS, 2016). Levando em consideração que o locus desse gene, em humanos é no cromossomo 13, a sua alteração em LMA com t(8;13) pode estar, fortemente, relacionado ao prognóstico da doença (POZZO et al., 2017).

Na rede de HDAC2, destacam-se as proteínas MTA1 e MTA2 (envolvidas no processo de regulação da metástase, inativado quando há modificação nas proteínas histonas) (KUMAR & WANG, 2016), DNMT1 (envolvida na metilação do DNA, assim como DNMT3A) e MBD2 (responsável pela metilação de Ilhas CpG, como citado anteriormente).

TP53 apresentou correlação tanto para HDAC1 quanto HDAC2. Para HDAC1, relacionam-se os GOs: 0034349 (Processo apoptótico de células da glia), GO:1903799 (Regulação negativa na produção de miRNA envolvidos no silenciamento gênico por miRNA), GO:0001085 (Ligação de fator de transcrição da RNA polimerase II) e GO:0097718 (Ligação específica à domínio desordenado). Sendo o primeiro, diretamente relacionado à manutenção do sistema imune e inibição da progressão de células tronco em gliomas (NABISSI et al., 2015), já os seguintes referem-se aos processos de manutenção do maquinário celular e manutenção do genoma. Semelhante aos *RBI*, *TP53* também é um dos principais genes supressores de tumor, podendo agir tanto na regulação da apoptose quanto na manutenção do ciclo celular (LANCET et al., 2018).

Além disso o loci do *TP53* encontra-se no cromossomo 17, sendo a translocação 15;17 (q12;q21) uma das mais comuns para LMA e t-LMA ambas com prognóstico desfavorável (CHAUFFAILLE, 2001; NAKAJIMA, 2019). Já em HDAC2, observa-se o GO:0042826: Ligação histona desacetilase (modulador de expressão gênica) e GO:0010225: Resposta à UV-c que, segundo SAMUDIO, 2016, é capaz de modular a ativação de NK inibidoras de células leucêmicas pela inativação de HSV-1, via Radiação UV.

6. CONCLUSÃO

- As análises *in silico* das HDAC1 e HDAC2 evidenciaram correlação com importantes proteínas relacionadas ao processo de carcinogênese, tais como o TP53, RB1, MTA1, MTA2 e DNMT1
- Ambos compostos (LDT565 e LDT566) apresentaram perfil citotóxico na linhagem HL60. No entanto, o composto LDT565 destaca-se pela estabilidade entre os resultados de IC50 a partir de 24h de incubação (24h = 1,83; 48h = 1,19; 72h = 1,43).
- Os hidroxamatos sintéticos (LDT565 e LDT566) apresentaram ação inibitória similar à sua versão comercial (Vorinostat) nas primeiras 12hs de incubação.
- Ambos compostos inibiram a expressão dos genes *HDAC1* e *HDAC2* após 12h de incubação. Por outro lado, após 24h de incubação o composto LDT566 inibiu a expressão de *HDAC1* e *HDAC2*, e o composto LDT565 inibiu somente a expressão da *HDAC2*.
- Comparando as proteínas das matrizes (nós), com seus Processos Biológicos e Funções Moleculares e a patogênese da LMA, observa-se correlações já descritas na literatura. Como, por exemplo, alterações nos genes *TP53*, *RB1* e *DNMT3A*, todos relacionados a prognósticos desfavoráveis para Leucemia mieloide aguda. Demonstrando que os experimentos realizados *in vitro* podem ter equivalência em sistemas biológicos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ANDREEFF, M. et al. Hexamethylene bisacetamide in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia: a phase II clinical trial with a differentiation-inducing agent. **Blood**, v. 80, n. 10, p. 2604–2609, 1992.
- BARCELLINI, W.; GIANNOTTA, J. A.; FATTIZZO, B. Autoimmune complications in hematologic neoplasms. **Cancers**, v. 13, n. 7, p. 1532, 2021.
- BECKER, H. et al. Sole Trisomy 8 in patients (pts) with DE Novo acute myeloid leukemia (AML) is associated with age-independent poor outcome that is modified by molecular markers and with unique gene- and microRNA (miR)-signatures: A cancer and leukemia group B (CALGB) study. **Blood**, v. 116, n. 21, p. 577–577, 2010.
- BETZ, R. et al. Human histone deacetylase 2, HDAC2 (Human RPD3), is localized to 6q21 by radiation hybrid mapping. **Genomics**, v. 52, n. 2, p. 245–246, 1998.
- BLANQUART, C. et al. Epigenetic metalloenzymes. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 15, p. 2748–2785, 2019.
- BOŠKOVIĆ, A.; RANDO, O. J. Transgenerational epigenetic inheritance. **Annual review of genetics**, v. 52, n. 1, p. 21–41, 2018.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 22, p. 2059–2074, 2013.
- CHATTERJEE, N. et al. Histone deacetylase inhibitors modulate miRNA and mRNA expression, block metaphase, and induce apoptosis in inflammatory breast cancer cells. **Cancer biology & therapy**, v. 14, n. 7, p. 658–671, 2013.
- CHAUFFAILLE, M. L. et al. Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 735–743, 2001.
- CHRUN, E. S.; MODOLO, F.; DANIEL, F. I. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis”. **Pathol Res Pract**, v. 17, p. 30318–30325, 2017.
- CONTE, M. et al. HDAC2-dependent miRNA signature in acute myeloid leukemia. **FEBS letters**, v. 593, n. 18, p. 2574–2584, 2019.
- COSTA-PINHEIRO, P. et al. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. **Epigenomics**, v. 7, n. 6, p. 1003–1015, 2015.
- DARWICHE, N. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 7, p. 1954–1978, 2020.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, “epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887–896, 2015.

DERR, R. S. et al. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1, HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients. **BMC cancer**, v. 14, n. 1, p. 604, 2014.

DÖHNER, H. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, v. 129, n. 4, p. 424–447, 2017.

EL-SISI, M. G. et al. Serum levels of FAK and some of its effectors in adult AML: correlation with prognostic factors and survival. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 476, n. 5, p. 1949–1963, 2021.

FAUBERT, B.; SOLMONSON, A.; DEBERARDINIS, R. J. Metabolic reprogramming and cancer progression. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6487, 2020.

FEDERICO, M.; BAGELLA, L. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of hematological malignancies and solid tumors. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 1–12, 2011.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, n. ijc.33588, 2021.

GUO, P. et al. The histone acetylation modifications of breast cancer and their therapeutic implications. **Pathology oncology research: POR**, v. 24, n. 4, p. 807–813, 2018.

HAN, Z.-J. et al. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). **International journal of oncology**, 2018.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARRINGTON, L. A.; TANNOCK, I. F.; HILL, R. P. **The Basic Science of Oncology**. [s.l.] McGraw Hill, 2021.

HAUER, M. H.; GASSER, S. M. Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. **Genes & development**, v. 31, n. 22, p. 2204–2221, 2017.

HAUSMAN, D. M. What is cancer? **Perspectives in biology and medicine**, v. 62, n. 4, p. 778–784, 2019.

HINSHAW, D. C.; SHEVDE, L. A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. **Cancer research**, v. 79, n. 18, p. 4557–4566, 2019a.

HUANG, M. et al. Histone acetyltransferase inhibitors: An overview in synthesis, structure-activity relationship and molecular mechanism. **European journal of medicinal chemistry**, v. 178, p. 259–286, 2019.

HURWITZ, R. L.; SHIELDS, C. L.; SHIELDS, J. A. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2016.

ILANGO, S. et al. Epigenetic alterations in cancer. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 25, n. 6, p. 1058–1109, 2020.

JAISWAL, S. Clonal hematopoiesis and nonhematologic disorders. **Blood**, v. 136, n. 14, p. 1606–1614, 2020.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, 2009.

KENNY, R. G. et al. Vorinostat and Belinostat, hydroxamate-based anti-cancer agents, are nitric oxide donors. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 206, n. 110981, p. 110981, 2020.

KIM, M. Y. et al. Regulating the regulators: The role of histone deacetylase 1 (HDAC1) in erythropoiesis. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8460, 2020.

KIRÁLY, A. P. et al. Az onkohematológia molekuláris diagnosztikai vizsgálómódszereinek alapjai [Introduction to the molecular diagnostic methods of oncohematology. **Magy Onkol**, v. 60, n. 2, p. 88–98, 2016.

KUMAR, R.; WANG, R.-A. Structure, expression and functions of MTA genes. **Gene**, v. 582, n. 2, p. 112–121, 2016.

LANCET, J. E. et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 36, n. 26, p. 2684–2692, 2018.

LEDERBERG, J. Genetic approaches to somatic cell variation: summary content. **J. Cell. Comp. Physiol**, v. 52, p. 383–401, 1958.

LEE-SIX, H. et al. Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. **Nature**, v. 561, n. 7724, p. 473–478, 2018.

LI, J. et al. HDAC2-mediated upregulation of IL-6 triggers the migration of osteosarcoma cells. **Cell biology and toxicology**, v. 35, n. 5, p. 423–433, 2019.

LI, T. et al. Histone deacetylase 6 in cancer. **Journal of hematology & oncology**, v. 11, n. 1, 2018.

LI, Y.; SETO, E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 10, p. a026831, 2016.

LODISH, B. et al. **Molecular cell biology**. New York: W. H. Freeman, 2004.

MACHADO, I. S. **Análise dos efeitos do microambiente tumoral na capacidade metastática do câncer de boca**. [s.l.: s.n.].

MANDA-HANDZLIK, A. et al. The influence of agents differentiating HL-60 cells toward granulocyte-like cells on their ability to release neutrophil extracellular traps. **Immunology and cell biology**, v. 96, n. 4, p. 413–425, 2018.

MARTELLI, M. P. et al. Mutational landscape of AML with normal cytogenetics: Biological and clinical implications. **Blood reviews**, v. 27, n. 1, p. 13–22, 2013.

MCCLURE, J. J.; LI, X.; CHOU, C. J. Advances and challenges of HDAC inhibitors in cancer therapeutics. In: **Advances in Cancer Research**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 183–211.

MEDINGER, M.; PASSWEG, J. R. Acute myeloid leukaemia genomics. **British journal of haematology**, v. 179, n. 4, p. 530–542, 2017.

MIRANDA FURTADO, C. L. et al. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2019.

NABISSI, M. et al. Cannabidiol stimulates Aml-1a-dependent glial differentiation and inhibits glioma stem-like cells proliferation by inducing autophagy in a TRPV2-dependent manner: Cannabidiol and GSCs differentiation. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 137, n. 8, p. 1855–1869, 2015.

NAGINI, S. Breast cancer: Current molecular therapeutic targets and new players. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 17, n. 2, p. 152–163, 2017.

NAKAJIMA H. Genetic abnormalities in AML. **Rinsho ketsueki [The Japanese journal of clinical hematology]**, v. 60, n. 6, p. 584–593, 2019.

NANNEY, D. **The role of the cytoplasm in heredity, p. 134 in The Chemical Basis of Heredity**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1957.

NEGANOVA, M. E. et al. Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress. **Seminars in cancer biology**, 2020.

NIRMALADEVI, R. Epigenetic alterations in cancer. **Frontiers in bioscience**, v. 25, n. 6, p. 1058–1109, 2020.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 23, p. 2209–2221, 2016.

PARK, G. et al. Regulation of histone acetylation by autophagy in Parkinson disease. **The journal of biological chemistry**, v. 291, n. 7, p. 3531–3540, 2016.

PLUTYNSKI, A. **Explaining cancer: Finding order in disorder**. 1. ed. New York, NY: Oxford University Press, 2018.

POZZO, A. R. et al. DNA microarray expression profiling of a new t(8;13) AML case allows identification of possible leukemogenic transformation markers. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 39, n. 4, p. 368–371, 2017.

RAGHUNATHAN, S.; GOYAL, R. K.; PATEL, B. M. Selective inhibition of HDAC2 by magnesium valproate attenuates cardiac hypertrophy. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 95, n. 3, p. 260–267, 2017.

RAN, X. et al. Characterization of the role of host cellular factor histone deacetylase 10 during HIV-1 replication. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 28, 2019.

RIO-MACHIN, A. et al. The complex genetic landscape of familial MDS and AML reveals pathogenic germline variants. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 2020.

SAMUDIO, I. et al. UV-inactivated HSV-1 potently activates NK cell killing of leukemic cells. **Blood**, v. 127, n. 21, p. 2575–2586, 2016.

SANCHEZ, R.; MACKENZIE, S. A. Integrative network analysis of differentially methylated and expressed genes for biomarker identification in leukemia. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 2123, 2020.

SAYGIN, C.; CARRAWAY, H. E. Current and emerging strategies for management of myelodysplastic syndromes. **Blood reviews**, v. 48, n. 100791, p. 100791, 2021.

SHINSKY, S. A.; CHRISTIANSON, D. W. Polyamine deacetylase structure and catalysis: Prokaryotic acetylpolyamine amidohydrolase and eukaryotic HDAC10. **Biochemistry**, v. 57, n. 22, p. 3105–3114, 2018.

SONG, Y. et al. Hybrid inhibitors of DNA and HDACs remarkably enhance cytotoxicity in leukaemia cells. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 35, n. 1, p. 1069–1079, 2020.

SUN, J. et al. Valproic acid targets HDAC1/2 and HDAC1/PTEN/Akt signalling to inhibit cell proliferation via the induction of autophagy in gastric cancer. **The FEBS journal**, v. 287, n. 10, p. 2118–2133, 2020.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SWAMINATHAN, M.; WANG, E. S. Novel therapies for AML: a round-up for clinicians. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 13, n. 12, p. 1389–1400, 2020.

THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: 5 feb. 2022.

TOPPER, M. J. et al. The emerging role of epigenetic therapeutics in immunology. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 17, n. 2, p. 75–90, 2020.

TRAPANI, J. A.; DARCY, P. K. Immunotherapy of cancer. **Australian family physician**, v. 46, n. 4, p. 194–199, 2017.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 667–679, 2017.

VOSO, M. T. et al. MRD in AML: The role of new techniques. **Frontiers in oncology**, v. 9, 2019.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, 2012.

WELCH, J. S. et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 264–278, 2012.

WOOD, H. Blocking HDAC2–Sp3 interaction — a new approach to AD therapy? **Nature reviews. Neurology**, v. 13, n. 10, p. 577–577, 2017.

YAZBECK, V. Y.; GRANT, S. Romidepsin for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 7, p. 965–979, 2015.